

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 10 月 27 日 (27.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/100546 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 5/00, 15/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004699

(22) 国際出願日: 2004 年 3 月 31 日 (31.03.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人
東京都医学研究機構 (TOKYO METROPOLITAN OR-
GANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH) [JP/JP]; 〒
1600023 東京都新宿区西新宿二丁目 8 番 1 号 Tokyo
(JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 小林 直哉 (KOBAYASHI, Naoya) [JP/JP]; 〒
7038261 岡山県岡山市海吉 2 0 3 3 - 1 5 Okayama
(JP). 田中 紀章 (TANAKA, Noriaki) [JP/JP]; 〒7190252
岡山県浅口郡鴨方町六条院中 3 2 3 5 - 1 Okayama
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小原 道法 (KO-
HARA, Michinori) [JP/JP]; 〒1140014 東京都北区田端
3 - 1 5 - 3 - 4 0 8 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 朝日奈 宗太, 外 (ASAHINA, Sohta et al.); 〒
5400012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目 2 番 2 2 号
N S ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された
生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REVERSIBLY IMMORTALIZED MAMMALIAN LIVER CELLS AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 可逆性不死化哺乳類肝臓細胞およびその用途

(57) Abstract: Reversibly immortalized mammalian liver cell lines, in particular, CYNK-1 (accession no. FERM BP-08657, deposited date: 10 March, 2004 (10.03.04), deposited with International Patent Organism Depositary (IPOD), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Chuo 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, 305-8566 JAPAN) which contains an immortalizing gene located between a pair of site-specific recombination sequences and having a suicide gene at a site excluding the above-described pair of site-specific recombination sequences, characterized in that the suicide gene can exhibit its function after cutting off the pair of site-specific recombination sequences, or successive lines thereof; mammalian liver cells obtained by eliminating the immortalizing gene from the immortalized mammalian liver cells line or successive lines thereof; and use of these cells. By using the immortalized mammalian liver cell lines as described above, liver cells in a required number can be surely obtained and used as materials for artificial liver reactors and cell preparations.

(57) 要約: 本発明は、一対の部位特異的組換え配列に挟まれた不死化遺伝子を含むし、かつ該一対の部位特異的組換え配列外に自殺遺伝子を含む可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株であって、該一対の部位特異的組換え配列を切り出したのちに自殺遺伝子が作動し得ることを特徴とする可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株、特には CYNK-1 (寄託機関: 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566)、寄託日: 平成 16 年 3 月 10 日、受託番号: FERM BP-08657) またはそれらの継代株、該可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株またはその継代株から不死化遺伝子を除去することにより得られる哺乳類肝臓細胞、ならびにそれらの細胞の用途に関する。本発明の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株を用いることにより、需要に見合った数の肝臓細胞を確保でき、人工肝臓リアクターや細胞製剤の材料としても使用できる。

WO 2005/100546 A1

明 細 書

可逆性不死化哺乳類肝臓細胞およびその用途

技術分野

本発明は、可逆的に増殖可能であり、復帰後の細胞においても自殺遺伝子を含む不死化哺乳類肝臓細胞および該肝臓細胞を用いたバイオ人工肝臓や細胞製剤に関する。

背景技術

現在、日本におけるC型肝炎感染者数は200万人（米国では400万人）、B型肝炎の患者数は約150万人（中国ではB型肝炎に感染している患者は1億2000万人以上）と報告されている（日経サイエンス、2000年2月号、肝炎情報センター）。C型肝炎の合併症により日本では年間約9000人が死亡し、2010年までに死亡数は3倍に跳ね上がると予想されている。

このような予測から、肝細胞移植や肝不全治療用バイオ人工臓器に対するニーズは高く、代謝性肝疾患でのヒト肝細胞移植の有効例が報告されている（Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP., Transplantation (1997) 63: 559-569 および Fox IJ, Roy Chowdhury J, Kaufman SS, et al., New Eng. J. Med. (1998) 338: 1422-1426）。

また、欧米、中国では、すでにブタ肝細胞を使用したバイオ人工肝臓治療がヒトで行われているが、ブタ内因性レトロウイルス感染などの人畜共通感染症が問題視されており、今後の進展が厳しい現状にある。

こうした細胞移植やバイオ人工肝臓のソースとしては健常ヒト細胞が理想であるが、深刻なドナー不足から当該細胞の入手はきわめて困難である。

よって、胚性幹細胞 (embryonic stem (ES) 細胞)、幹細胞、異種動物の細胞が研究されている。しかしながら、幹細胞や前駆細胞を利用する際には、こうした細胞の多分化能と活発な増殖能自体に由来する制御の困難さが本質的に内包されており、肝細胞への分化誘導に関する報告があるものの充分ではない (Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, et al., Cell Transplant. 2003; 12: 1-11; Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al., J. Clin. Invest. 109; 1291-1302, 2002)。また、異種動物の細胞では、移植細胞が最終的に拒絶される保証は無く、異種動物との安定なキメラ状態やHLA非適合の同種腫瘍の偶発的な生着がヒトにおいて報告されている (Gartner et al., N. Eng. J. Med., 335, 1494, (1996); K. Paradis et al., Science, 285, 1236, (1999))。

一方、癌遺伝子を導入して細胞を不死化することにより、適度な分化機能を保持した細胞株を産出できることが知られている (Kobayashi N, et al., Transplantation 69: 202-207, 2000) が、不死化細胞株を、生体内に注入することにより、またはバイオ人工肝臓などの体外循環補助装置に使用することにより、予期せぬ癌化の危険性に患者を曝す可能性がある。

不死化遺伝子を導入して細胞を不死化し、増殖した後に該不死化遺伝子を切り出すことができる可逆性不死化細胞も研究されている (Westerman KA, Leboulch P., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93: 8971-8976, 1996)。しかしながら、レトロウイルスベクターを使用する際には、ウイルスの構造上のLTRが腫瘍性を引き起こすなどの問題点や、導入されるコピー数が多くなるといった欠点がある。また、不死化遺伝子を部位特異的組換え酵素により切り出したとしても、遺伝子操作を行なった細胞が残留し、こうした細胞が宿主に対して悪影響 (腫瘍を形成してくるなど) を及ぼす可能性がゼロではないことから、治療を受ける患者に不安を与える可能性がある」と指摘されている。

本発明は、従来の問題点を解消し、健常ヒト肝臓細胞に替わる、大量に増殖可能で、その生存を制御することのできる、より安全性の高い可逆性不死化哺乳類肝臓細胞およびそれを用いたバイオ人工肝臓や細胞製剤を提供することを目的とする。

発明の開示

前記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、我々は、一对の部位特異的組換え配列に挟まれた不死化遺伝子の外側に自殺遺伝子をコードするベクターを哺乳類の肝臓細胞に導入することにより、可逆的に増殖可能な不死化細胞であって、かつ不死化遺伝子を除去したのちに自殺遺伝子が作動し得るという特徴を有する安全な肝臓細胞株を樹立できることを見出し、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、一对の部位特異的組換え配列に挟まれた不死化遺伝子を含むし、かつ該一对の部位特異的組換え配列外に自殺遺伝子を含む可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株であって、該一对の部位特異的組換え配列を切り出したのちに自殺遺伝子が作動し得ることを特徴とする可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株またはその継代株に関する。

前記可逆性不死化哺乳類肝臓細胞において、哺乳類がヒトであることが好ましい。

前記可逆性不死化哺乳類肝臓細胞がウイルス由来のプロモーターを含むことが好ましい。

前記可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株がCYNK-1（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）であることが好ましい。

本発明はまた、前記可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株またはその継代株から不死化遺伝子を除去することにより得られる哺乳類肝臓細胞（以下、復帰細胞という）に関する。

本発明はさらに、前記可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株もしくはその継代株またはそれらの復帰細胞を含有するバイオ人工肝臓に関する。

本発明はまた、前記可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株もしくはその継代株またはそれらの復帰細胞を含有する細胞製剤に関する。

本発明は、非ウイルス性プロモーターを含有し、一对の部位特異的組換え配列間に不死化遺伝子をコードし、かつ該一对の部位特異的組換え配列外に自殺遺伝子をコードする非ウイルスベクターに関する。

図面の簡単な説明

図1は、非ウイルスベクターpYK1を示す模式図である。ここで、ATGは開始コドン、CAGはCAGプロモーター配列、LoxPはLoxP配列、HygRはハイグロマイシン耐性遺伝子、HSVTKは単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ、EMCV IRESは脳心筋炎ウイルス内リボゾームエントリー部位、SV40Tはシミアンウイルス40ラージT抗原遺伝子、ZeoRはゼオシン耐性遺伝子、pAはポリAシグナルをそれぞれ示す。

図2は、非ウイルスベクターpYK1の製造方法の一例を示す図である。ここで、ATGは開始コドン、CAGはCAGプロモーター配列、LoxPはLoxP配列、HygRはハイグロマイシン耐性遺伝子、HSVTKは単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ、EMCV IRESは脳心筋炎ウイルス内リボゾームエントリー部位、SV40Tはシミアンウイルス40ラージT抗原遺伝子、ZeoRはゼオシン耐性遺伝子、pAはポリAシグナルをそれぞれ示す。

図3は、Cre DNA組換え酵素によるLoxP配列の切り出し機構を示す図である。ここで、ATGは開始コドン、LoxPはLoxP配列、HygRはハイグロマイシン耐性遺伝子、HSV TKは単純ヘルペスウイルススーチミジンキナーゼ、EMCV IRESは脳心筋炎ウイルス内リボゾームエントリー部位、SV40 Tはシミアンウイルス40 ラージT抗原遺伝子、ZeoRはゼオシン耐性遺伝子、pAはポリAシグナルをそれぞれ示す。

図4は、可逆性不死化ヒト肝細胞CYNK-1（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）の位相差顕微鏡写真である。部分1は核小体を示し、部分2は核小体を有する大きな核を示し、部分3は細胞内顆粒を示す。

図5は、本発明のバイオ人工肝臓リアクターの一実施態様を例に、作製過程の一実施態様を示す図である。図5（a）は裏打ち4が施された不織布5の上に中空糸膜6を並べた図である。ここで、裏打ち4が施された不織布5にはスリット7が設けられている。図5（b）は、図5（a）をロール状に巻く過程を示す図である。図5（c）は、図5（b）のX-X線断面拡大図である。図5（d）は、両端に液漏れ防止部材8を設けた筒状容器9に中空糸膜6と不織布5からなるロールを組み込んだバイオ人工肝臓リアクター10を表わす概略図である。リアクターには細胞注入口11および細胞のサンプル採取を行なうことが可能な取り出し口12が設けられており、スリット7は、細胞注入口11と連絡するように配置される。

図6（a）は、CYNK-1（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3

月10日、受託番号：FERM BP-08657)における肝特異的遺伝子およびSV40T遺伝子の発現を示す写真である。レーン1から7は、それぞれアルブミン遺伝子、アシアログリコプロテイン受容体(以下、ASGPRという)遺伝子、肝臓性ビリルビン-ウリジンジフォスフェートグルクロノシルトランスフェラーゼ(以下、ビリルビン-UGTという)遺伝子、グルタミンスンセターゼ(以下、GSという)遺伝子、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ π (以下、GST- π という)遺伝子、ヒト血液凝固因子X(以下、HBCF-Xという)遺伝子およびSV40T遺伝子の発現を示す。Mはマーカーを示す。

図6(b)は、復帰CYNK-1細胞における肝特異的遺伝子およびSV40T遺伝子の発現を示す写真である。レーン1から7は、それぞれアルブミン遺伝子、ASGPR遺伝子、ビリルビン-UGT遺伝子、GS遺伝子、GST- π 遺伝子、HBCF-X遺伝子およびSV40T遺伝子の発現を示す。Mはマーカーを示す。

図7は、可逆性不死化ヒト肝細胞CYNK-1(寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、寄託日：平成16年3月10日、受託番号FERM：BP-08657)のガンシクロビル感受性を示すグラフである。

図8は、ガンシクロビルで処理した可逆性不死化ヒト肝細胞CYNK-1(寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657)の位相差顕微鏡写真である。死滅した細胞13が観察される。

図9は、ガンシクロビルで処理した復帰CYNK-1細胞の位相差顕微

鏡写真である。死滅した細胞 13 が観察される。

図 10 は、D-ガラクトサミン投与後のブタの生存曲線を示すグラフである。

図 11 は、バイオ人工肝臓治療にて可動後の、BAL-1 の不織布の走査電子顕微鏡写真である。細胞 14 は、不織布の繊維 15 に良好に付着している。

図 12 は、バイオ人工肝臓治療にて可動後の、BAL-1 の中空糸膜の走査電子顕微鏡写真である。中空糸膜 16 の表面には、細胞が一切付着していない。

発明を実施するための最良の形態

本発明において、「可逆性不死化」または「可逆的に増殖可能な」とは、不死化遺伝子を細胞に形質導入して、当該細胞を無限に増殖可能な状態にしたものであって、目的の細胞数まで増殖させた後、当該不死化遺伝子を取り除くことで、細胞増殖を停止し、元の安全性の高い状態に復帰させることのできる状態を意味する。

本発明で用いられる哺乳類の肝臓細胞は、たとえば豚、猿、類人猿、ヒトの肝臓細胞などであり、好ましくはヒトの肝臓細胞である。たとえば、ヒトの成人肝臓細胞およびヒトの胎児肝臓細胞などを本発明に使用することができる。

本発明に用いられる「肝臓細胞」とは、たとえば肝機能の指標であるアルブミンや各種凝固因子などのタンパク質の産生能、糖新生能、尿素産生能、血液の解毒および浄化能、ならびに、アミノ酸、糖質、および脂質代謝能を有する細胞である。具体的には、肝細胞、肝類洞内皮細胞、肝星状細胞、ピット細胞およびクッパー細胞などがあげられる。

本発明に使用する肝臓細胞は、商業的に入手可能である（たとえば、三

光純薬株式会社、大日本製薬株式会社など）。

本発明において「部位特異的組換え配列」とは、部位特異的組換え酵素によって認識される特異的な塩基配列であり、同一のDNA分子上に同方向の一对の配列が存在する場合は、この配列間でDNA鎖の切断が行なわれる。

部位特異的組換え配列としては、LoxP配列やFRT配列などがあるが、LoxP配列が好ましい。LoxP配列は、Cre組換え酵素によって認識される公知の部位特異的組換え配列であり、同一のDNA分子上に同方向の一对のLoxP配列が存在する場合は、大腸菌のP1ファージ由来であるCre組換え酵素が、1) 34塩基 かなるLoxP配列を認識し、2) その部位に結合してLoxP配列間にコードされるDNAを切り出すという一連の反応を単独で行なうことが出来る。

したがって、一对のLoxP配列間にコードさせた遺伝子は、後にCre組換え酵素を作用させることで切り出すことができる。

本発明において「不死化遺伝子」とは、ヒト体細胞を無限分裂寿命化する遺伝子を意味し、たとえば、SV40T遺伝子およびヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)遺伝子などがあげられる。

前記SV40T遺伝子は、公知のDNA型腫瘍ウイルスの腫瘍抗原(T抗原)遺伝子である。

前記hTERT遺伝子は、正常細胞のTERT遺伝子由来である。hTERT遺伝子は、血液、皮膚、腸管粘膜、子宮内膜など、生涯にわたり再生を繰り返している臓器の幹・前駆細胞、および特定の抗原に暴露するたびにクローン増殖しているリンパ球では自然と発現増強している遺伝子である。

本発明において「自殺遺伝子」とは、細菌やウイルス由来の酵素であって、活性の低いプロドラッグを代謝して強い細胞障害活性のある物質に変

換させる働きを有する酵素をコードする遺伝子を意味し、このような自殺遺伝子が導入された細胞は、プロドラッグの投与により選択的に死滅する。

したがって、自殺遺伝子を標的とする細胞に導入した場合、プロドラッグの投与により目的に応じて標的細胞を選択的に除去することができる。代表的な自殺遺伝子とプロドラッグとの組み合わせとしては、単純ヘルペスのチミジンキナーゼ（H S V T K）遺伝子と抗ウイルス剤として臨床で用いられているガンシクロビルとの組み合わせ、大腸菌のシトシンデアミナーゼ遺伝子と抗菌剤である 5-フルオロシトシンとの組み合わせなどがあげられる（Elion GB. Am. J. Med. 73, 7, 1982; Craig AM. Proc. Acad. Sci. USA 89, 33, 1992）。本発明で使用する自殺遺伝子としては、その有効性が既に動物実験にて証明されおり（Moolten FL, Wells JM: J Natl Cancer Inst. 82: 297-300, 1990; Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH. Science 1992; 256: 1550）、さらに、ヒト前立腺癌の遺伝子治療の臨床応用においてもその有効性が確認されている点から H S V T K 遺伝子が好ましい。

本発明の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞は、一对の部位特異的組換え配列に挟まれた不死化遺伝子と、該一对の部位特異的組換え配列外に自殺遺伝子とをコードする DNA 配列を、ベクターにより哺乳類肝臓細胞に導入することにより作製することができる。

ベクターとしては、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターのいずれも使用することができるが、ウイルスベクターは、組み換えウイルスベクター産生細胞の培養上清をろ過し、目的とする細胞に添加するだけで効率よく遺伝子導入が可能である点では好ましいが、ウイルスの構造上の L T R が腫瘍性を引き起こすなどの問題点があり、また、導入されるコピー数も多くなるといった欠点も有する。したがって、非ウイルスベクターを使用することが好ましい。

このようなベクターとしては、たとえば、非ウイルス性プロモーターCAGを含有し、Cre組換え酵素の標的となる一対のloxP配列間にSV40T遺伝子とハイグロマイシン耐性(HygR)・単純ヘルペスウイルスーチミジンキナーゼ(HSVTK)融合遺伝子とをコードし、さらに該loxP配列外にゼオシン耐性(ZeoR)・HSVTK融合遺伝子を同時にコードする非ウイルスベクターpYK1(図1)が使用できる。ここで、非ウイルス性プロモーターとしては、CAGプロモーターやCMV(サイトメガロウイルス)プロモーターなどが使用できるが、発現の強さからCAGプロモーターの方が好ましい。なお、CAGプロモーターは、サイトメガロウイルスIEエンハンサー(cytomegalovirus IE enhancer)、チキンβ-アクチンプロモーター(chicken β-actin promoter)およびウサギβ-グロビンポリアダニル化シグナル(rabbit β-globin polyadenylation signal)から構成されており、以下の論文を参照することで当業者なら製造可能である(Kanegae Y, Takamori K, Sato Y, et al., Gene (1996) 181: 207-212.)。

非ウイルスベクターの導入方法としては、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、ヌクレオフェクターなどを用いたエレクトロポレーション法があげられる。遺伝子の導入効率の面からは、ヌクレオフェクターなどを用いたエレクトロポレーション法が好ましい。

当該遺伝子導入及びその後の不死化株の樹立、継代に関しては、無血清培地での細胞培養が好ましい。無血清培地としては、CS-C無血清培地やISE-RPMIやHGM (hepatocyte growth medium)などがある。調達的面から、たとえば、セルシステムズ(Cell System)社(シアトル、ワシントン州、米国)や大日本製薬株式会社より入手可能なCS-C無血清培地が好ましい。

以上より、本発明の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞のなかでも、正常ヒト

肝細胞に非ウイルス性ベクターである p Y K 1 を導入することにより樹立した C Y N K - 1 細胞株（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1

中央第 6（郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6）、寄託日：平成 1 6 年 3 月 1 0 日、受託番号：F E R M B P - 0 8 6 5 7）およびその継代株が最も好ましい。また、本発明の可逆性不死化肝臓細胞は、図 2（C Y N K - 1 細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6（郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6）、寄託日：平成 1 5 年 3 月 1 0 日、受託番号：F E R M B P - 0 8 6 5 7））に示すように、数個の核小体 1 を有する大きな核 2 をもった細胞内顆粒 3 に富んだ、いわゆる肝臓の実質細胞の形態学的特徴を有する。

本発明の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞は、前述したように部位特異的組換え酵素を作用させることにより不死化遺伝子を除去することができる。組換え酵素は、前述したように使用する部位特異的組換え配列に合わせて、当業者が容易に選択し得る。

部位特異的組換え酵素を作用させる方法としては、たとえば、C r e 組換え酵素の場合、（1）遺伝子導入効率の良好なアデノウイルスベクターにより C r e 組換え酵素を形質導入する方法、（2）リン酸カルシウム法にて、C r e 組換え酵素 DNA を細胞培養液中に添加する方法、（3）培養上清中に、ヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus）（H I V）由来の T A T タンパク質と C r e 組み換え酵素との融合タンパク質を添加する方法、（4）C r e 組換え酵素タンパク質をカチオニック化して、細胞培養液中に添加する方法、さらに（5）薬剤誘導性 C r e 組み換え酵素発現ベクターを導入することにより、薬剤を添加することで該遺伝子の除去を自由に起こさせるシステムを付加する方法などがあげられる。

本発明の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株またはその継代株から不死化遺伝子を除去することにより得られる復帰細胞は、復帰前の細胞よりやや大型化し、数個の核小体を有する核をもった細胞内顆粒に富んだ、いわゆる肝臓の実質細胞の形態学的特徴を維持している。

一方、肝機能不全を改善するための肝臓細胞としては、いくつかの生化学的な要求を満たさなければならない。すなわち、i) ビリルビン血漿や黄疸を軽減する、ii) 高アンモニア血症に起因する肝性脳症の改善、iii) 血液の解毒と浄化作用、iv) アルブミンや血液凝固因子の補給、などである。高アンモニア血症の軽減はとりわけ、肝性脳症および脳死の進展防止に重要である (Strom SC. Transplantation 63, 559, 1997)。グルタミンシンセターゼ (GS) は、アンモニア除去の主要な酵素であり、肝機能不全を改善するための樹立肝細胞株としては、この酵素の発現が重要である (Strom SC. Transplantation 63, 559, 1997)。

したがって、可逆性不死化哺乳類肝臓細胞およびその継代細胞ならびにそれらの復帰細胞は、少なくともアルブミン遺伝子、ビリルビン-UGT 遺伝子、GS 遺伝子、GST- π 遺伝子およびHBCF-X 遺伝子のいずれかが発現していることが好ましく、これらすべての遺伝子が発現していることがより好ましい。

このような、本発明の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞およびその継代細胞ならびにそれらの復帰細胞は、バイオ人工肝臓や細胞製剤として種々の肝疾患の治療に使用することができる。

本発明における「肝疾患」としては、たとえばウイルス、薬剤、そして中毒 (キノコ等) による急性肝不全などの肝不全、血友病、 $\alpha 1$ -抗トリプシン欠損症、ガラクトース血症、肝腎性チロシン血症、カエデシロップ尿症、糖原病 1a 型、肝性ポルフィリン症、低ベータリポ蛋白血症、高コレステロール血症、原発性高シュウ酸尿症 1 型、クリグラー-ナジャー症

候群1型、高フェニルアラニン血症などの代謝性肝疾患、慢性肝疾患の急性増悪などが含まれる。本発明の治療剤は、肝不全および代謝性肝疾患の治療に用いられることが好ましい。

本発明の細胞製剤は、前記可逆性不死化哺乳類肝臓細胞もしくはその継代細胞またはそれらの復帰細胞を、培地、等張液、または緩衝液に懸濁した懸濁液、もしくは遠心などにより濃縮したペレットなどの細胞塊などがあげられる。培地、等張液、または緩衝液は、前記肝臓細胞に適合するよう適宜選択される。さらに、前記細胞製剤は、DMSOなどの保護剤を加え、凍結保存することもできる。また、前記細胞製剤としては、ヒト体内に接種されることを考慮して、不死化遺伝子を除去した復帰細胞を使用することが好ましい。細胞製剤は、より安全に利用するために、加熱処理、放射線処理、あるいはマイトマイシンC処理など、細胞製剤としての機能を残しつつ、病原細胞のタンパク質が変性する程度の条件下で処理をすることができる。

細胞製剤の投与形態（移植方法）としては、経門脈的投与、腹くう内投与、脾臓内投与などが使用できる。なかでも、経門脈的投与や脾臓内投与がさらに好ましく、経門脈的投与が最も好ましい。細胞製剤の投与量（移植量）は、1億個～100億個／固体が好ましく、5億個～100億個／固体がさらに好ましく、10億個から100億個／固体が最も好ましい。また、投与量（移植量）は、投与される患者の年齢、体重、症状などによって適宜変更することができる。

バイオ人工肝臓としては、中空糸型のリアクター（デバイス）と分離・培養細胞を組み合わせたバイブリッド型の人工肝臓などが挙げられる。バイオ人工肝臓は、体外に装着して血管に接続するもの、体内に留置して血管に接続するもの、または血管に接続せずに腹腔内に留置するものの三つの形態がある。本発明の可逆性不死化肝臓細胞および復帰肝臓細胞はどち

らも、いずれの形態のバイオ人工肝臓にも使用可能である。

バイオ人工肝臓の開発においては、リアクターの設計・開発も重要な要素である。バイオリアクターとしては、サーシ バイオメディカル社 (Circe Biomedical Inc.) (レキシントン、マサチューセッツ州、米国) の支援下でシダーズサイナイ医療センター (Cedars-Sinai Medical Center) (ロサンジェルス、カリフォルニア州、米国) のディメトリユー (Demetriou) らを中心としたブタ肝細胞を用いたバイオ人工肝臓治療用のヘパトアシスト (HepatAssist) (Hui T, Rozga J, Demetriou AA. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2001; 8: 1-15.) や、ブタ肝細胞を使用したドイツの Gerlach らの M E L S (モジュラー体外肝臓システム (Modular Extracorporeal Liver System)) など、様々なタイプが知られている。これらのリアクターは、もちろん本発明において使用することができるが、肝細胞が付着するための足場が無い場合、細胞はただ単に、中空系内スペースか、中空系外スペースに充填されるのみで浮遊した状態となる傾向がある。肝細胞は、浮遊状態では、分化機能が十分に発現されない傾向があり、さらに周りの細胞と衝突し、ストレス刺激を受けやすい。したがって、本発明においては、肝細胞に足場が提供できるよう、中空系と不織布からなるリアクターが好ましい。

中空系膜としては、膜表面に細胞が付着して物質交換が妨げられることがなければどのようなものでも使用することができ、具体的には、従来医療用に用いられている市販の物、たとえば、ポリスルホン膜、エチレン-酢酸ビニルランダム共重合体けん化物膜 (たとえば、商品名: エバール、クラレメディカル株式会社製など) などが好ましい。市販の中空系膜のポアサイズは、その用途から透析膜 (~ 5 nm)、血漿成分分離膜 (20 ~ 30 nm)、血漿分離膜 (30 ~ 200 nm) などがある。物質の透過性の点からは、血漿分離膜 (30 ~ 200 nm) が好ましい。

不織布としては、細胞が接着することが出来るように加工・修飾されているものが好ましい。なかでも、その加工のしやすさの点から、ポリ四フッ化エチレン（P T F E）にポリアミノ酸ウレタン（P A U）加工を施したものが好ましい。

本発明のバイオ人工肝臓リアクターの一実施態様を例に、ハウジングまでの過程を図5に示す。裏打ち4を施した不織布5上に中空糸膜6を置く（図5（a））。ここで、裏打ち4を施した不織布5にはスリット7が設けられている。これをロール状に巻く（図5（b））。そのX-X線断面が図5（c）である。これを両端に液漏れ防止部材8を設けた筒状容器9に組み込む。リアクターには細胞注入口11および細胞のサンプル採取を行なうことができる取り出し口12が設けられており、スリット7は、細胞注入口11と連絡するように配置される。

また、バイオ人工肝臓治療は、安全かつ科学的に施行するために、1）人工肝臓リアクターの流入圧と流出圧のリアルタイムでのモニタリング、2）気泡が発生した際のアラームの作動、3）リアクターの温暖化（37度）などができる機能を一体化した装置で実施されることが好ましい。

以下、具体的な実施例をあげて本発明を説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

非ウイルスベクターpYK-1の製造

非ウイルスベクターpYK-1（図1）を以下の手順で作製した（図2参照）。

（1）ゼオシン耐性遺伝子（ZeoR）フラグメントを得るために、pCMV/Zeo（インビトロジェン社製）を鋳型にし、5'側にXhoIを組み込んだプライマーP3、3'側にHSV TKを組み込んだプライマーP5'をゼオシン領域の両端に設定し、これを用いて反応条件、95℃、

5分、(95℃、30秒、60℃、30秒、72℃、2分)×30サイクル、72℃、15分でPCR反応を行なった。P3プライマーは、ゼオシン開始コドン抜き、ゼオシンが発現できないようにした。

(2) HSVTKフラグメントを得るためにSSR#69 (Westerman KA, Leboulch P., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93: 8971-8976, 1996) を鋳型にし、プライマーP6'、P7をHSVTK領域の両端に設定し、これを用いて反応条件、95℃、5分、(95℃、30秒、60℃、30秒、72℃、2分)×30サイクル、72℃、15分でPCR反応を行なった。

(3) ゼオシン、HSVTK結合フラグメントを得るために前記(1)で回収したゼオシン、前記(2)で回収したTKフラグメントのミックスを鋳型にし、プライマーP3、P7を用いて反応条件、95℃、5分、(95℃、30秒、61℃、1分、72℃、3分)×30サイクル、72℃、15分でPCR反応を行なった。プライマーP5'の3'側とP6'の5'側は相補的に設計してあるため、このPCRによりゼオシンおよびHSVTKフラグメントは結合された。

(4) ハイグロマイシン耐性遺伝子、HSVTK遺伝子、EMCV-IRE S遺伝子、SV40T遺伝子を含むフラグメントを得るために、SSR69を鋳型にし、この領域の両端に設定したプライマーP1、P2を用いて反応条件、95℃、5分、(95℃、30秒、60℃、1分、72℃、5分)×30サイクル、72℃、15分でPCR反応を行なった。

なお、P1プライマーの5'側にはHCV5'UTRとLoxPが、P2プライマーの3'側にはLoxPおよびXhoIが組み込んである。

得られたPCR産物は、NuSieveアガロースとSeaKemアガロースとを3:1の割合で混合したものを1.2%含有するゲルで電気泳動した後、DNACELL (第一化学薬品株式会社製) で精製し、回収した。

次いで、ゼオシン、HSVTK結合フラグメントをXho I、T4PNK処理し、Xho I、Sma I処理したLoxPスイッチング発現ベクターであるpCALNL5/pBR322Hに、LigaFast Rapid DNA Ligation System (プロメガ (Promega) 社) を用いて挿入ライゲーションした。なお、pCALNL5/pBR322Hは、pCALNL5 (理研バンクRDB-1862) のpUC OriをpBR322 Oriに交換することにより作製した。エレクトロポレーションによりコンピテントセル (JM109) に形質転換し、アンピシリンを含むLBプレートで選抜した。得られたクローンをMlu I、T4pol、Xho Iで処理したものに、Xho I、T4K処理したハイグロマイシン耐性遺伝子、HSVTK遺伝子、EMCV-IRES遺伝子、SV40T遺伝子を含むフラグメントを挿入し、コンピテントセル (JM109) に形質転換し、アンピシリンを含むLBプレートで選抜し、pYK1を製造した。

実施例 2

可逆性不死化ヒト肝細胞株CYNK-1 (寄託機関: 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)、寄託日: 平成16年3月10日、受託番号: FERM BP-08657) の樹立

T-25フラスコ内で80%コンフルエントの状態の継代数1の正常ヒト肝細胞 (CS-ABI-3716、大日本製薬株式会社販売) をトリプシン処理し、100万個のヒト肝細胞を得た。これを、ヌクレオフェクターシステム用緩衝液 (Nucleofector™ Solution、和光純薬工業株式会社製) 1mlで希釈し、そこにpYK-1のプラスミドDNAのTE緩衝液 (TE buffer、シグマ社製) の懸濁液 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) $2 \mu\text{l}$ を添加して、ヌクレオフェクターシステム (Nucleofector™ システム、和光純薬工業株式会社製) に

より、該システムのプロトコールにしたがって遺伝子導入した。得られた細胞をT-25フラスコに播種し、CS-C無血清培地（CS-SF-4Z0-500、大日本製薬株式会社販売）にて培養を継続した。遺伝導入して48時間後に、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のハイグロマイシン含有CS-C無血清培地にて、耐性クローンの選択を行なった。選択開始から2週間後に耐性クローンの出現を認め、4週間後にクローニングリングを使用し、CYNK-1細胞株（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）を樹立した。

この細胞を、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託した（あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）。

得られたCYNK-1細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）は、数個の核小体1を有する大きな核2をもった細胞内顆粒3に富んだ、いわゆる肝臓の実質細胞の形態学的特徴を示した（図4）。CYNK-1細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）は、増殖が停止する危機（クライシス）もなく不死化し、無血清のCS-C培地下に単層に増殖し、約48時間でその数が倍加した。

実施例3

C r e組換え酵素によるS V 4 0 T遺伝子の切り出し（図3参照）

核内局限信号（N L S）標識されたC r e組換え酵素を産生する複製不可能な組換えアデノベクターA x C A N C r e（ 3×10^8 p f u / m l）（理研ジーンバンク、日本、R D B N o. 1 7 4 8）をM O I（感染多重度）＝5でC Y N K－1細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号3 0 5－8 5 6 6）、寄託日：平成1 6年3月1 0日、受託番号：F E R M B P－0 8 6 5 7）に感染させた。A x C A N C r eで1時間感染したのち、細胞をトリプシンで処理して回収し、5日間のゼオシン選択（ $5 \mu g / m l$ ゼオシン（シグマ社）含有C S－C無血清培地で培養）により完全なるS V 4 0 T遺伝子発現細胞の排除が達成された。一過性のC r e組換え酵素の発現で、L o x P配列間のDNAの切り出しが生じた。

得られた細胞は、復帰前の細胞よりやや大型化し、数個の核小体を有する核をもった細胞内顆粒に富んだ、いわゆる肝臓の実質細胞の形態学的特徴を維持していた。

試験例 1

S V 4 0 T遺伝子除去前後のC Y N K－1細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号3 0 5－8 5 6 6）、寄託日：平成1 6年3月1 0日、受託番号：F E R M B P－0 8 6 5 7）における遺伝子発現

R T－P C R法により、S V 4 0 T遺伝子切り出し前後のC Y N K－1細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号3 0 5－8 5 6 6）、寄託日：平成1 6年3月1 0日、受託番号：F E

RM BP-08657) において、肝臓代謝に関わる重要な遺伝子、すなわち、アルブミン遺伝子、アルブミン遺伝子、ASGPR遺伝子、ビリルビン-UGT遺伝子、GS遺伝子、GST- π 遺伝子およびHBCF-X遺伝子、ならびにSV40T遺伝子の発現を調べた。RT-PCR法では、RNAzol (シンナ/バイオテックス社、フレンズウッド、テキサス州、米国) を用いてCYNK-1細胞 (寄託機関: 独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)、寄託日: 平成16年3月10日、受託番号: FERM BP-08657) からRNAを抽出し、1 μ gの総RNAを22°Cで10分間、さらに42°Cで20分間、RNA逆転写酵素を用いて逆転写反応させた。

得られた2 μ gの逆転写産物を、各プライマー20 pmol/mlで、Amp1 iTag Goldキット (パーキナーエルマー/シートラス社、ノーウォーク、コネチカット州、米国) を用い、そのプロトコールにしたがってPCR増幅に用いた。PCRは95°Cで10分間インキュベーションし、95°Cで30秒、60°Cで30秒および72°Cで30秒からなるインキュベーションを35サイクル行ない、最後に72°Cで7分間インキュベーションして実施した。各遺伝子に対するプライマーには下記のものを使用した。

アルブミン遺伝子 (576 bp)

5' プライマー: AAACCTCTTGTGGAAGAGCC (配列番号1)

3' プライマー: CAAAGCAGGTCTCCTTATCG (配列番号2)

ASGPR遺伝子 (495 bp)

5' プライマー: TAGGAGCCAAGCTGGAGAAA (配列番号3)

号3)

3' プライマー: ACCTGCAGGCAGAAAGTCATC (配列番号4)

ビリルビン-UGT遺伝子 (495bp)

5' primer: ATGACCCGTGCCTTTATCAC (配列番号5)

3' primer: TCTTGGATTTGTGGGCTTTC (配列番号6)

GST- π 遺伝子 (496bp)

5' primer: GCCCTACACCGTGGTCTATT (配列番号7)

3' primer: GGCTAGGACCTCATGGATCA (配列番号8)

GS遺伝子 (535bp)

5' primer: ATGCTGGAGTCAAGATTGCG (配列番号9)

3' primer: TCATTGAGAAGACACGTGCG (配列番号10)

HBCF-X遺伝子 (493bp)

5' プライマー: GTGCATGGAAGAGACCTGCT (配列番号11)

3' プライマー: GAAGTCAAGCAGGTCGAAGG (配列番号12)

SV40T遺伝子 (422bp)

5' プライマー: CAGGCATAGAGTGTCTGC (配列番号13)

3' プライマー：CAACAGCCTGTTGGCATATG（配列番号14）

可逆性不死化の前後でこうした肝機能遺伝子の発現は保存され、Cre／loxP 組み替えによるSV40T 遺伝子除去が認められた（図6（a）および図6（b）参照）。また、当該結果は、SV40T 遺伝子の除去前後のCYNK-1 細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）にアルブミンや血液凝固因子といった生理活性物質を製造させ、細胞性医薬品の開発に応用することが可能であることを示唆するデータである。

試験例2

SV40T 遺伝子除去前後のCYNK-1 細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）のガンシクロビル感受性

200個のCYNK-1 細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）を96ウェルプレートに播種し、CS-C無血清培地のみ、または種々の濃度のガンシクロビル（5、10、20、50および100 μ M）を添加したCS-C無血清培地にて培養し、MTTアッセイ（Mcsmann T.J., Immunol. Methods, 65, 55, 1983）にて細胞増殖を検討した。

細胞の生存率を、相対的感受性として図7に示す。CYNK-1 細胞（

寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）のガンシクロビルに対する感受性は、ガンシクロビルの濃度に依存し、5 μ MのGCVで1週間培養することで増殖を停止し、一部の細胞は死滅した（図7および8）。

復帰CYNK-1細胞も同様にGCVに対して感受性を示し、5 μ MのGCV存在下で1週間培養することにより増殖を停止し、一部の細胞は死滅し（図9）、10日以内にすべての細胞が死滅した。

これらのデータは、細胞の増殖がガンシクロビルの投与にて制御可能であることを示す。

試験例3

復帰CYNK-1細胞による肝不全治療効果

T225の細胞培養フラスコ（コーニング社（Corning）、ニューヨーク州、米国）を使用して、CYNK-1細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）を、培養液A（CS-C無血清培地（CS-SF-4Z0-500、大日本製薬株式会社販売）に、0.1mg/L ストレプトマイシン、100U/ml ペニシリンGを加えたもの）を用い、室温37℃、二酸化炭素濃度5%のインキュベーターで培養した。CYNK-1細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）が増殖し、1個のフラスコにて2千万個の細胞を調達した。PBS（リン酸緩衝

生理食塩水)に0.02% EDTAを加えた0.25%トリプシン液8 mlを使用して、細胞をフラスコの表面から剥がし、さらに培養液Aを40 ml加えたて攪拌した後、4℃、800 rpm、7 minで遠心分離器にかけ細胞を回収した。得られたCYNK-1細胞(寄託機関:独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名:日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6(郵便番号305-8566)、寄託日:平成16年3月10日、受託番号:FERM BP-08657)

(3個のT225細胞培養フラスコ分、計6千万個)に培養液A30 mlを加え攪拌後、ローラーボトル(正式名:1700 cm² Expanded Surface Roller Bottle、コーニング社)に播種し、培養液A500 mlを加えて培養を行なった。4本のローラーボトルを、細胞製造ローラー装置(Cell preparation roller apparatus)(ベルコ(Bellico)社)を利用して、大量培養を施行した。細胞がコンフルエントになった状態で、アデノウイルスベクターAxCANCreを添加し、組み換え反応を起こした。AxCANCreを添加48時間後から5日間ゼオシン含有培地にて培養した後、同様にトリプシン処理して細胞を回収した。1本のローラーボトルから3億個、計4本で、12億個の復帰細胞が入手できた。

岡山県美星町農協より購入したランドレースホワイต์(Landrace White)種の雌性ブタ(5 kg)10頭を使用し、術前12時間絶食とした。硫酸アトロピン(扶桑薬品工業株式会社製、大阪、日本)0.5 mgおよび動物用ケタラル(塩酸ケタミン)(三共株式会社製、東京、日本)3 mgを筋肉注射し、鎮静後、ドロレプタン(ドロペリドール)(三共株式会社製、東京、日本)1 mg、ミオブロック(臭化パンクロニウム)(オルガノン社製、オランダ)2 mgを静脈内注射し、気管内挿管を行った。酸素、笑気、セボフルレンを使用し、人工呼吸器にて麻酔を維持し左外頸静脈を露出し、6 Frアトムチューブ(アトムメディカル株式会社製、東

京、日本)のカニューレーションを行った。そして、腹部正中切開にて開腹後、脾静脈から6Frアトムチューブ(アトムメディカル株式会社製、東京、日本)のカニューレーションを行い、先端を門脈本幹に留置した。先端が門脈本幹に位置していることを触診にて確認した。各々のアトムチューブの末端は、皮下トンネルを形成後、皮膚表面に縫合固定した。術前、術後にセパトレン(セファロスポリン系抗生物質)(住友製薬株式会社製、大阪、日本)0.5gを静脈内注射した。術後、完全に覚醒したのを確認し気管内チューブを抜去した。その後直ちに、左外頸静脈へ挿入されているアトムチューブから0.5g/kgのD-ガラクトサミン(シグマ社製)を生理食塩水50mlに溶解した後10分かけて静注し、薬剤性肝障害を誘導した。

各アトムチューブは血栓形成を防止するため、ヘパリン1ml(1000単位)にてロックした。D-ガラクトサミン投与18時間後に、ローラーボトル培養にて調達した10億個の復帰CYNK-1細胞をリンゲル液100mlに希釈して、脾静脈に挿入されている6Frアトムチューブから経門脈的に約30分かけて移植した(移植群、n=5)。コントロール実験として、残りの5匹は細胞を移植しなかった(コントロール群、n=5)。

ブタの全身状態の把握のため、心電図、心拍数、動脈圧のモニタリングを行った。移植群では、移植時に一過性の門脈圧の上昇(25cmH₂O)を認めたが、ブタは肝細胞移植に耐えることが出来た。

結果を図10に示す。コントロール群は全例肝不全にて死亡したが、復帰CYNK-1細胞移植群では5例中4例が1ヵ月以上生存し、統計学的に有意差を認めた。当該データは、復帰CYNK-1細胞の移植がヒト肝不全でも有効であることを示唆するものである。

実施例4

バイオ人工肝臓の作製

中空糸と不織布からなる全血還流型システムのバイオ人工肝臓（BAL）（図5参照）を以下の手順に従い作製した。中空糸膜の種類により、表1に示すように、それぞれBAL-1～BAL-6とした。

表 1

バイオ人工肝臓	中空糸膜	
	素材	ポアサイズ
BAL-1	ポリスルフォン ^{*1}	透析膜
BAL-2	ポリスルフォン	血漿分離膜
BAL-3	ポリスルフォン	血漿成分分離膜
BAL-4	エバール ^{*2}	透析膜
BAL-5	エバール	血漿分離膜
BAL-6	エバール	血漿成分分離膜

^{*1}クラレメディカル株式会社製

^{*2}クラレメディカル株式会社製

10cmの中空糸膜550本をレーヨンで裏打ちした不織布（10×10cm）の上に規則正しく置き（図5（a）参照）、これをロール状に巻き込んだ（図5（b）参照）。断面の模式図を図5（c）に示す。この不織布と中空糸膜からなるロールを、両端に液漏れ防止部材を設けた筒状容器に組み込んだ（図5（d）参照）。こうして作製されたリアクターに可逆性不死化肝細胞CYNK-1（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）約10億個をCS-C無血清培地（CS-SF-4Z0-500、大日本製薬株式会社販売）10mlに懸濁

して充填した。

なお、不織布としては、細胞接着性を有するポリアミノ酸ウレタン (PAU) 加工の P T F E (polytetrafluoroethylene) 不織布 (クラレメディカル株式会社製) を使用した。

得られたリアクターの生体適合性を判定するために、各リアクターをそれぞれ健常ブタの頸部動静脈間に装着して作動させたところ、24時間循環動態に悪影響なく無事に稼働させることができた。また、赤血球・血小板などの血球成分の減少も認めなかった。

また、BAL治療を安全かつ科学的に施行するために、1) BALリアクターの流入圧と流出圧のリアルタイムでのモニタリング、2) 気泡が発生した際のアラームの作動、3) リアクターの温暖化(37度)できる機能を一体化した装置を開発し、システムが良好に作動することをブタ実験にて検証した。

試験例 4

バイオ人工肝臓の肝不全治療効果

施設動物実験取り扱い指針に従い、検疫済みのカニクイザル(日本クレアから購入)を用いて実施例4において作製したバイオ人工肝臓の安全性と有効性を検討した。

雄性カニクイザル(4 kg、n=6)に、0.5 g/kgのD-ガラクトサミン(シグマ社から購入)を静注して薬剤性肝障害を誘導した。

D-ガラクトサミン投与18時間後に、全身麻酔下に治療群のサル(n=2)の左内頸動脈にアトム6Frのカテーテル(アトムメディカル株式会社、東京、日本)を挿入し、そして左外頸静脈にアトム6Frのカテーテルを挿入してその間に、実施例4で作製したリアクターBAL-1を接続した。ポンプにPERISTA BIO-MINIPUMP(ATTO、東京、日本)を用い、流量10 ml/分で6時間、体外循環させた。麻酔は、静脈麻酔として、デ

ユプリバンを使用した（5 ml /時間）。抗血栓療法として、血液がリアクターを通過する直前に、リアクターの中枢側よりヘパリン1000単位を注入し、以後体外循環中はヘパリンの持続注入（ヘパリン500単位/時間）により、全身ヘパリン化を行なった。

ポジティブ・コントロール群（n=2）として、CYNK-1細胞（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM B P-08657）の代わりに約10億個の新鮮分離ブタ肝細胞（生存率>90%）を充填したリアクターにより、治療群と同様にして6時間のBAL治療を施行した。新鮮分離ブタ肝細胞は、外科的に切除した肝臓外側区域をディスパーゼとコラーゲナーゼを用いた4段階還流法にて分離した（丸山昌伸，小林直哉，都津川敏範ら、Organ Biology、Vol.9, No.3. 295-301, 2002）。

ネガティブ・コントロール群（n=2）として、細胞を充填していない空リアクターを用いて、同様の試験を行なった。

結果は、ネガティブ・コントロール群では、2例のサルはいずれもD-ガラクトサミン投与後1週間以内に肝不全で死亡した。剖検では、肝臓の出血壊死、著名な萎縮、黄疸性の胸・腹水の貯留を認め、組織学的にも肝細胞の広範な壊死を認めた。一方、約10億個のブタ肝臓細胞を装填したポジティブ・コントロール群はいずれも3週間以上生存し、剖検所見でも一切の異常を認めなかった。

治療群では、2例とも3週間以上生存した。肝臓は肉眼的にも組織学的にも全く正常化していた。また、治療群では、フィシャー比（分岐鎖アミノ酸／芳香族アミノ酸の比）の改善を認めた。

治療後、リアクターを固定して細胞の付着の程度を走査電子顕微鏡下に

観察した。細胞は不織布の繊維に良好に付着しており（図11）、さらには数個の細胞からなる集塊が観察された。このような集塊は、細胞の分化機能の発揮に好ましい。一方、中空糸膜の表面には、細胞が一切付着しておらず（図12）、中空糸膜を介した物質交換を鑑みると非常に好ましい所見を得た。

産業上の利用可能性

本発明の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞は、需要に見合った数だけ容易に確保することができ、さらに安全性に優れ、患者に不安感を与えることなく、バイオ人工肝臓や細胞製剤の材料として使用することができる。また、本発明の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞は、アルブミンや血液凝固因子といった生理活性物質を製造することができるため、細胞性医薬品の開発にも応用可能である。また、復帰細胞は、さらに安全性に優れており、かつ、肝臓細胞の能力を保持し、肝臓疾患の治療において非常に有用である。

配列表フリーテキスト

配列番号1： アルブミン遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用5' primer

配列番号2： アルブミン遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用3' primer

配列番号3： ASGPR遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用5' primer

配列番号4： ASGPR遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用3' primer

配列番号5： ビリルビン-UGT遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用5' primer

配列番号6：ビリルビン－UGT遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用3' primer

配列番号7：GST－ π 遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用5' primer

配列番号8：GST－ π 遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用3' primer

配列番号9：GS遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用5' primer

配列番号10：GS遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用3' primer

配列番号11：HBCF－X遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用5' primer

配列番号12：HBCF－X遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用3' primer

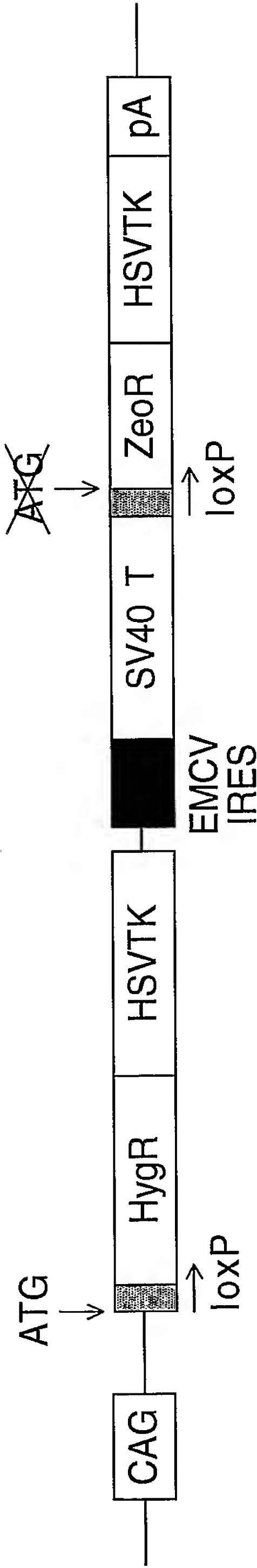
配列番号13：SV40T遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用5' primer

配列番号14：SV40T遺伝子を検出するためのポリメラーゼ連鎖反応用3' primer

請求の範囲

1. 一対の部位特異的組換え配列に挟まれた不死化遺伝子を含むし、かつ該一対の部位特異的組換え配列外に自殺遺伝子を含む可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株であって、該一対の部位特異的組換え配列を切り出したのちに自殺遺伝子が作動し得ることを特徴とする可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株またはその継代株。
2. 哺乳類がヒトである特許請求の範囲第1項記載の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株またはその継代株。
3. ウイルス由来のプロモーターを含むしない特許請求の範囲第1項記載の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株またはその継代株。
4. 可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株がCYNK-1（寄託機関：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、寄託日：平成16年3月10日、受託番号：FERM BP-08657）である特許請求の範囲第1項記載の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株またはその継代株。
5. 請求の範囲第1項記載の可逆性不死化哺乳類肝臓細胞株またはその継代株から不死化遺伝子を除去することにより得られる哺乳類肝臓細胞。
6. 請求の範囲第1項記載の可逆性不死化哺乳類細胞株もしくはその継代株または第5項記載の哺乳類肝臓細胞を含むバイオ人工肝臓。
7. 請求の範囲第1項記載の可逆性不死化哺乳類細胞株もしくはその継代株または第5項記載の哺乳類肝臓細胞を有効成分として含む細胞製剤。
8. 非ウイルス性プロモーターを含むし、一対の部位特異的組換え配列間に不死化遺伝子をコードし、かつ該一対の部位特異的組換え配列外に自殺遺伝子をコードする非ウイルスベクター。

FIG. 1



2 / 12

FIG. 2

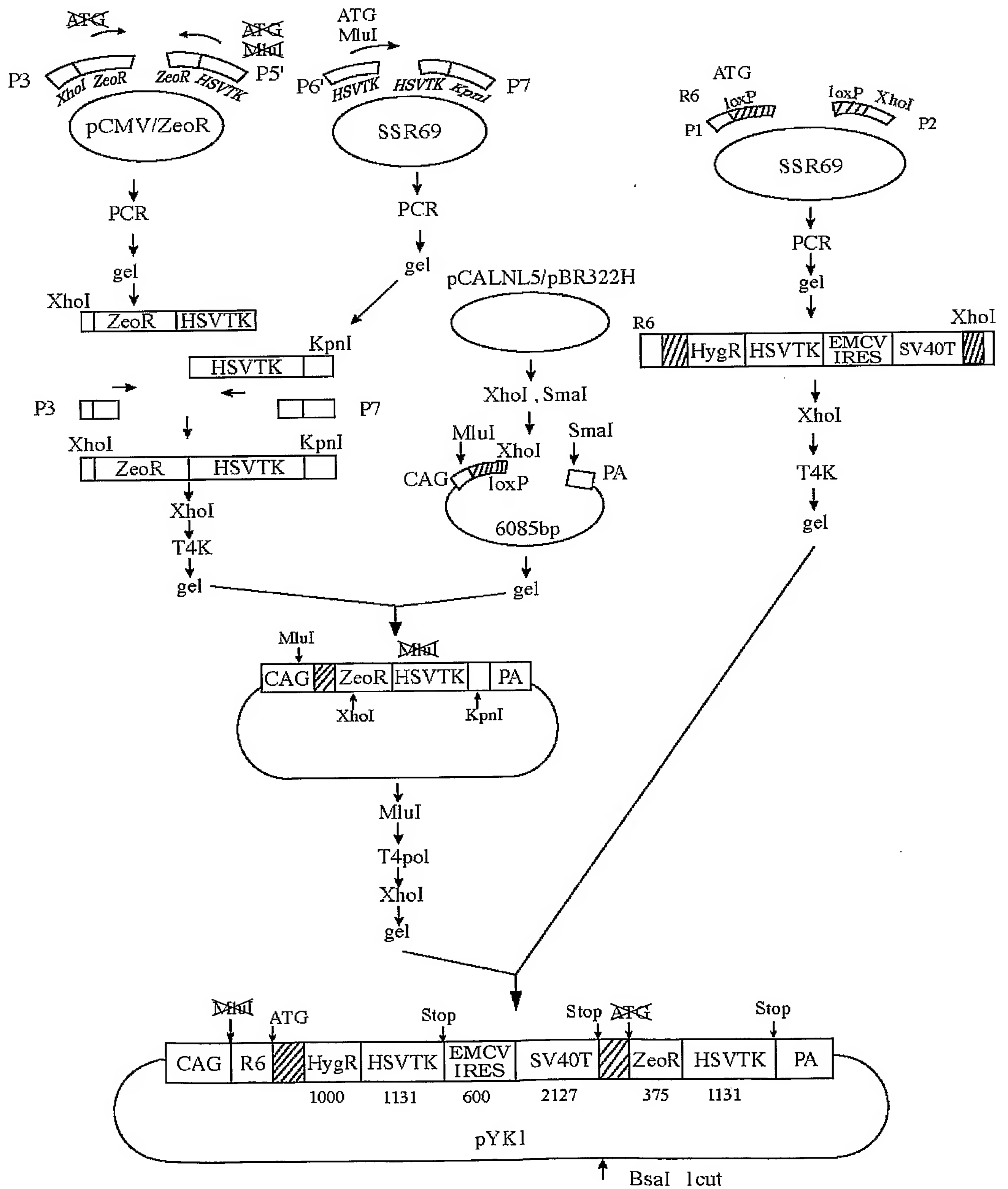


FIG. 3

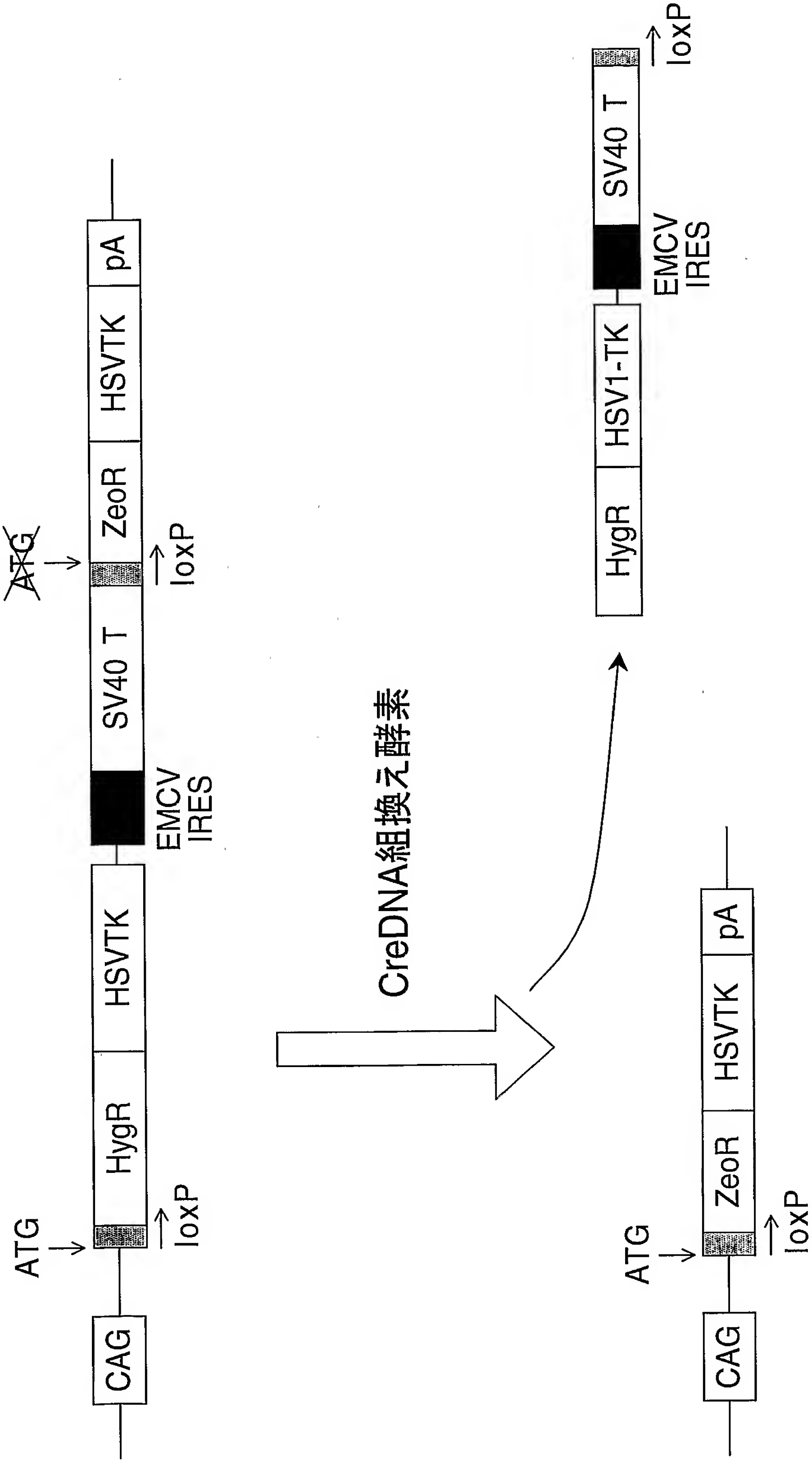


FIG. 4

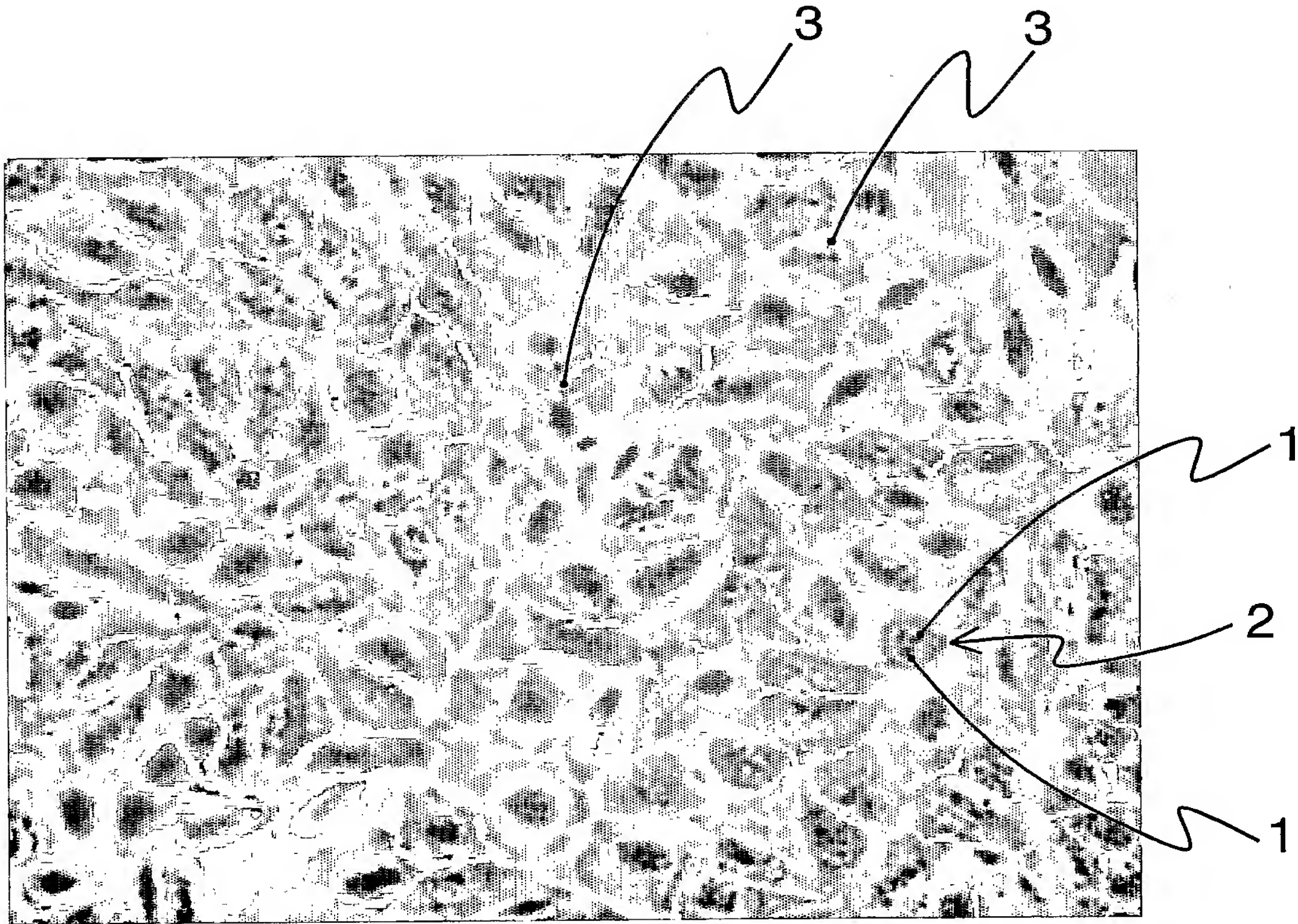


FIG. 5(a)

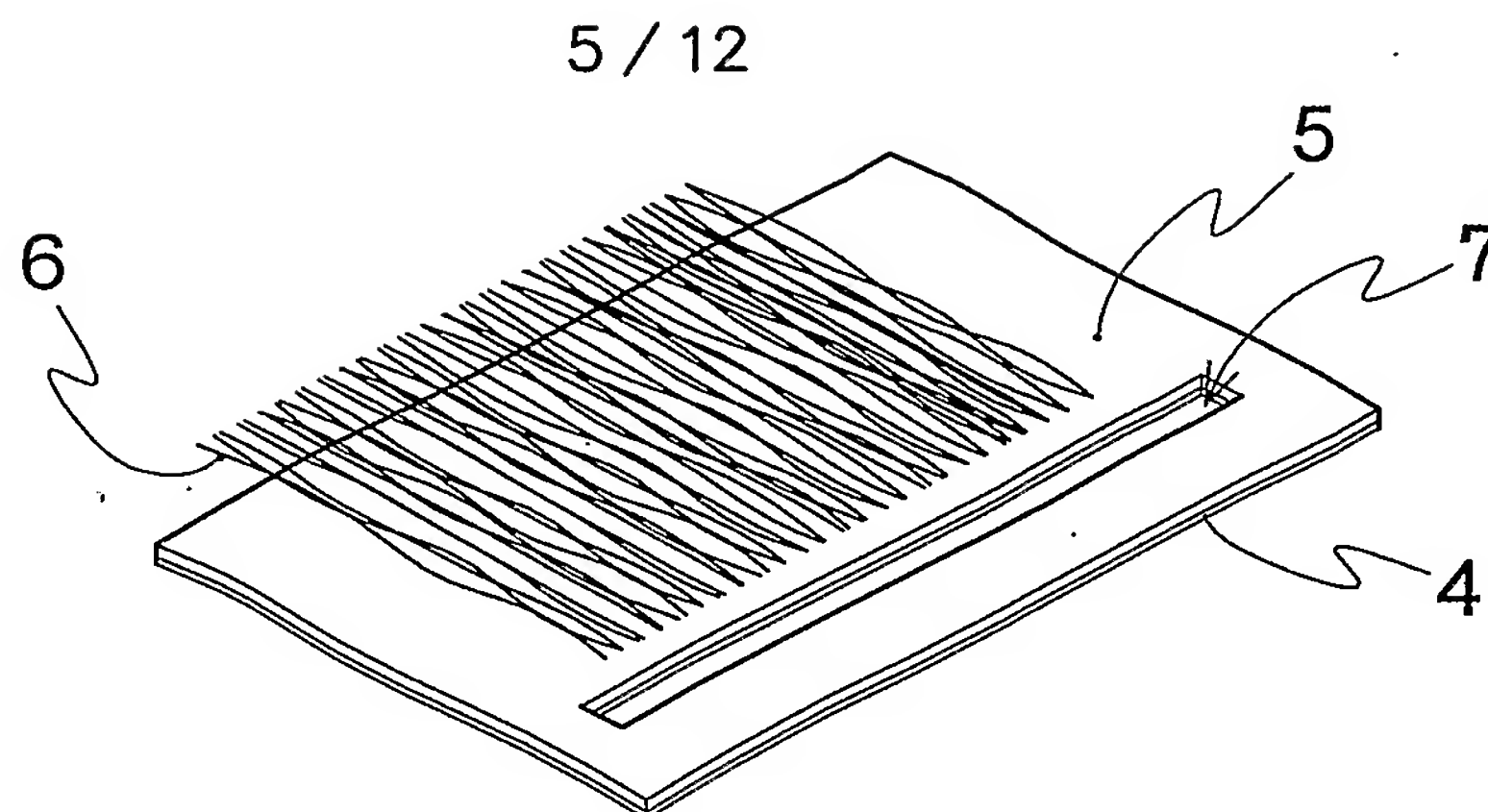


FIG. 5(b)

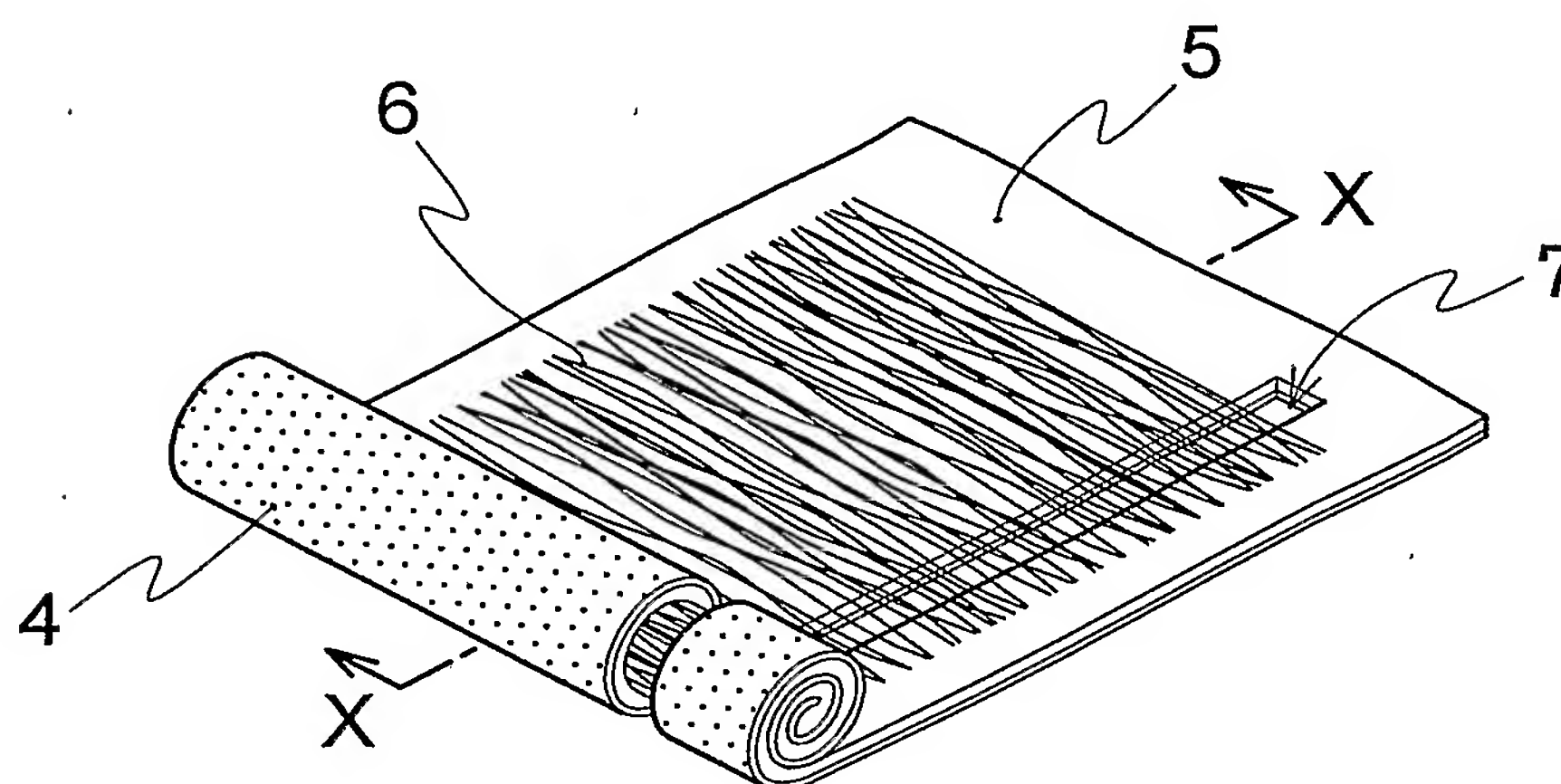


FIG. 5(c)

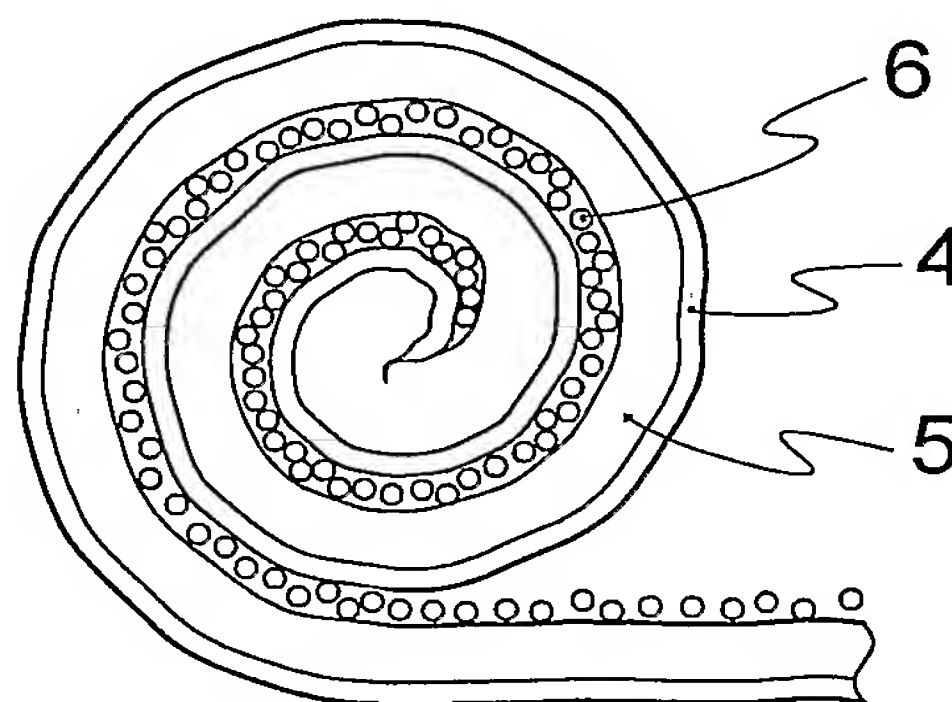


FIG. 5(d)

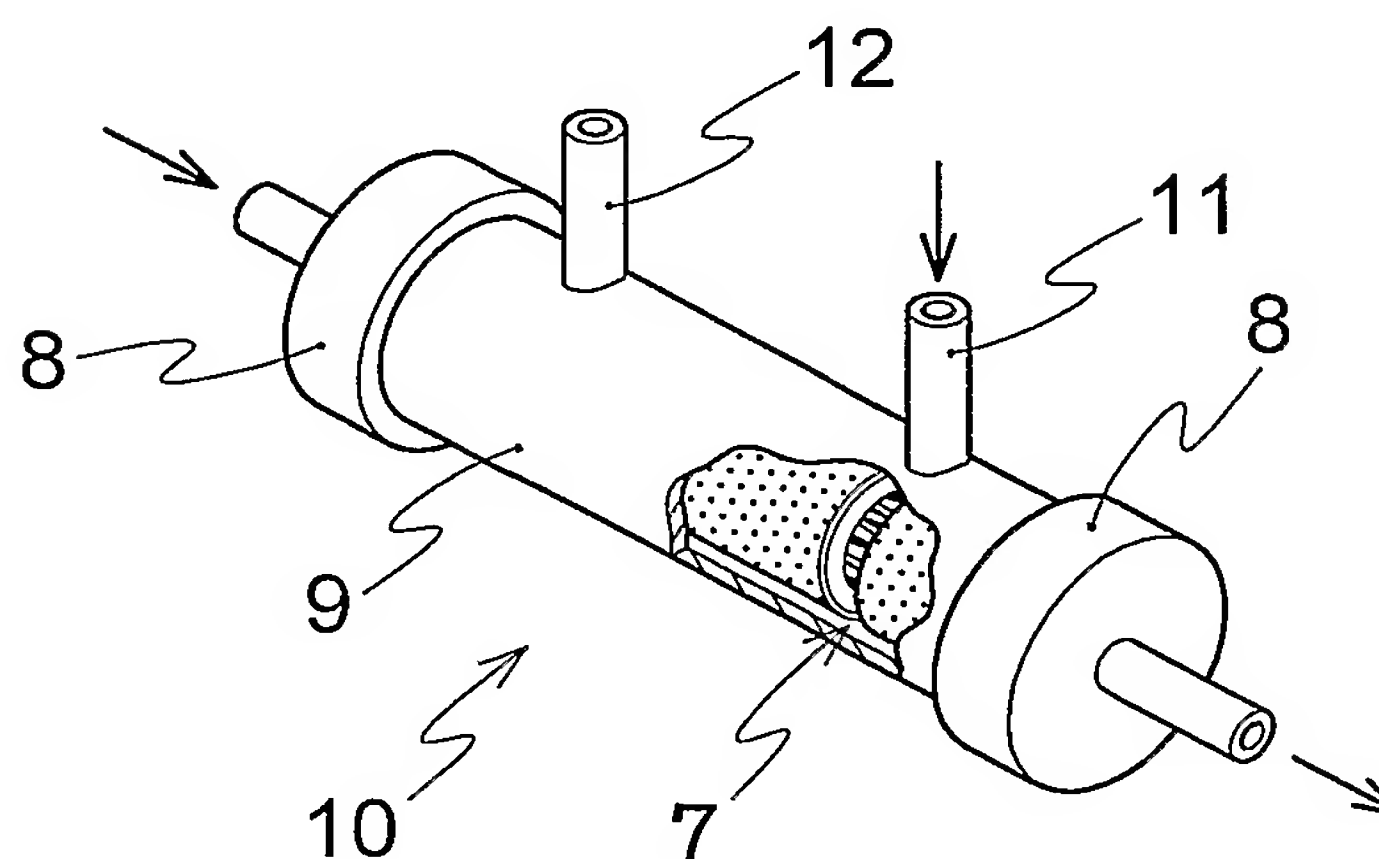


FIG. 6 (a)

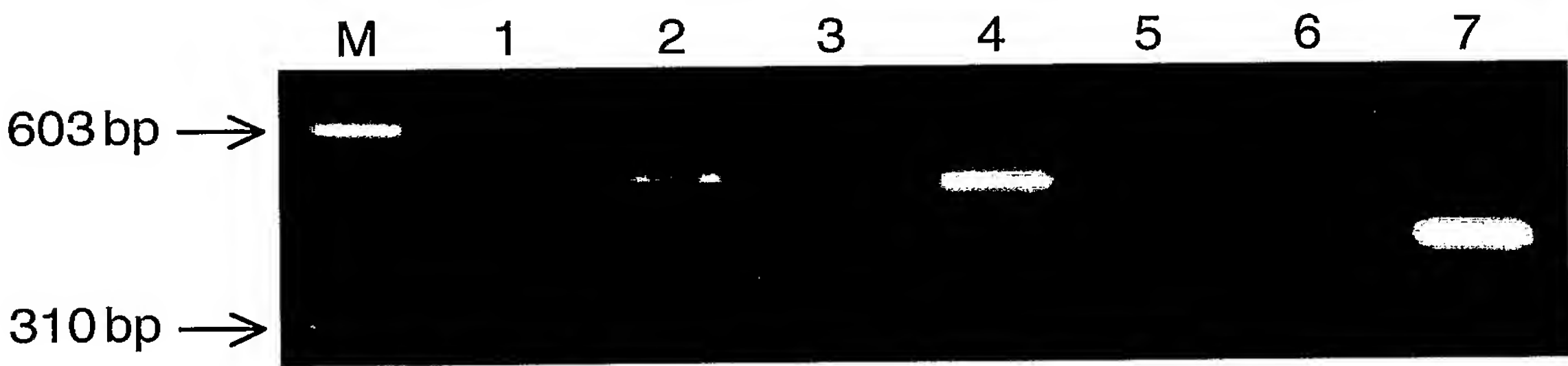
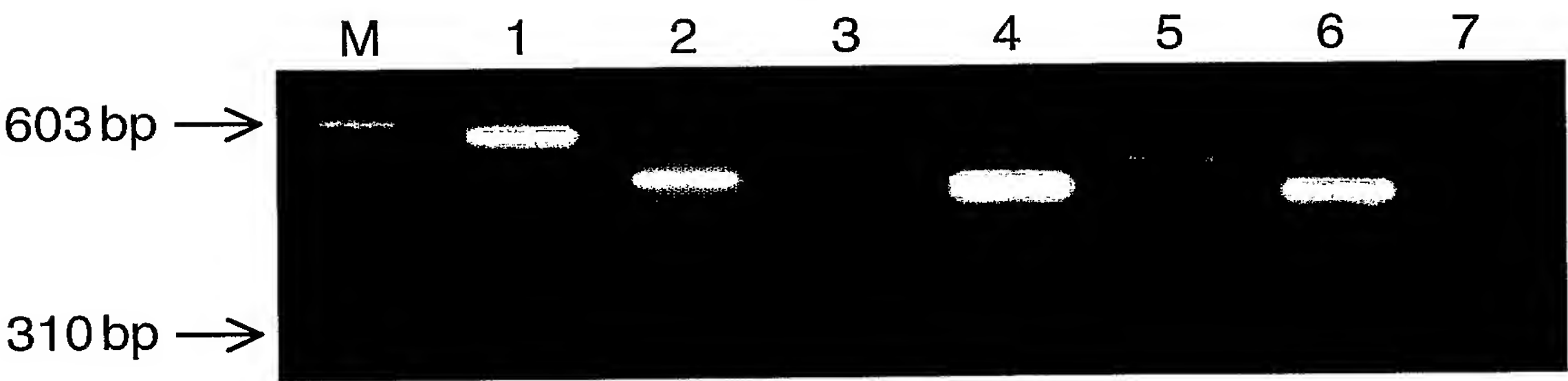


FIG. 6 (b)



7 / 12

FIG. 7

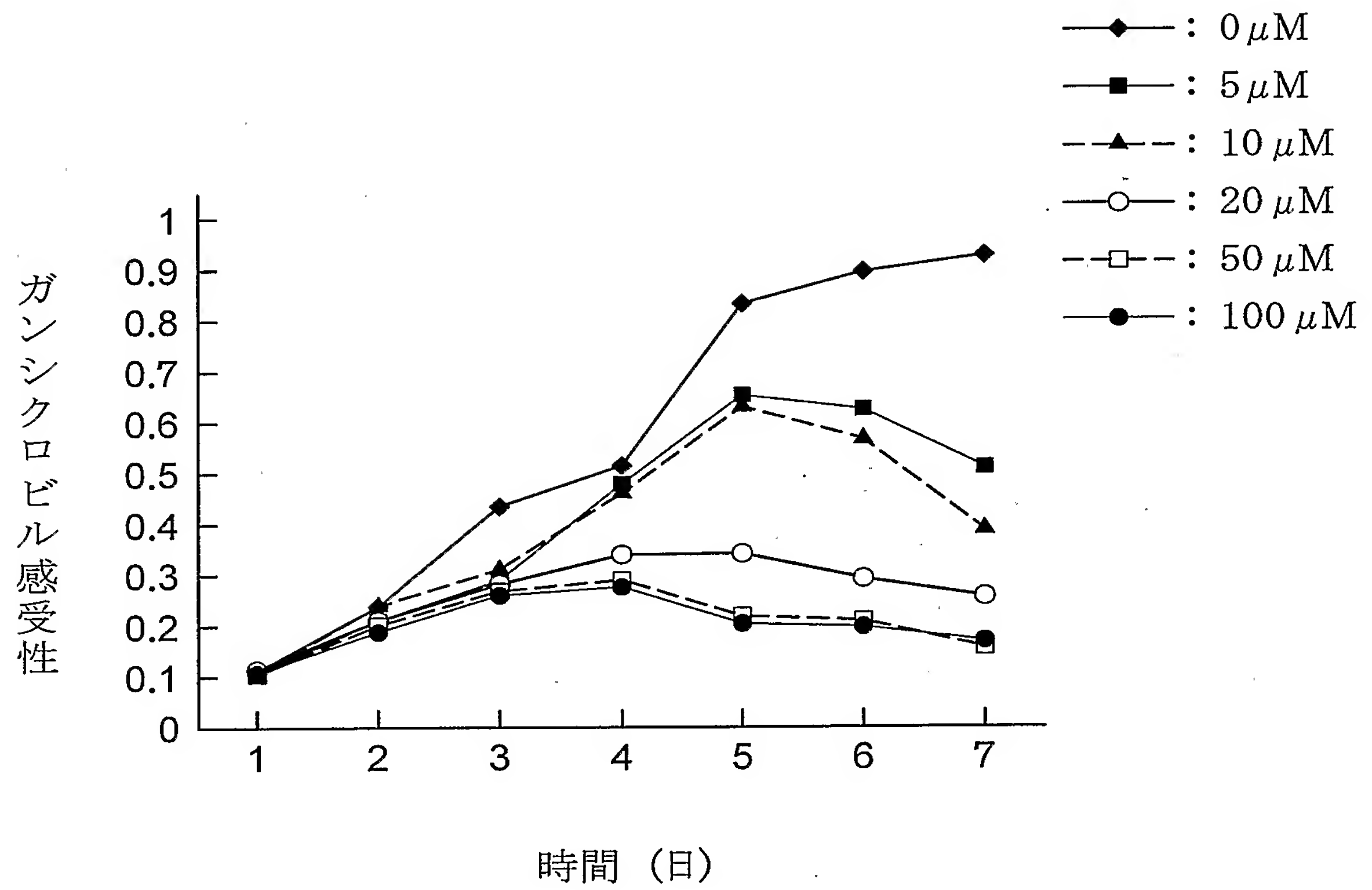
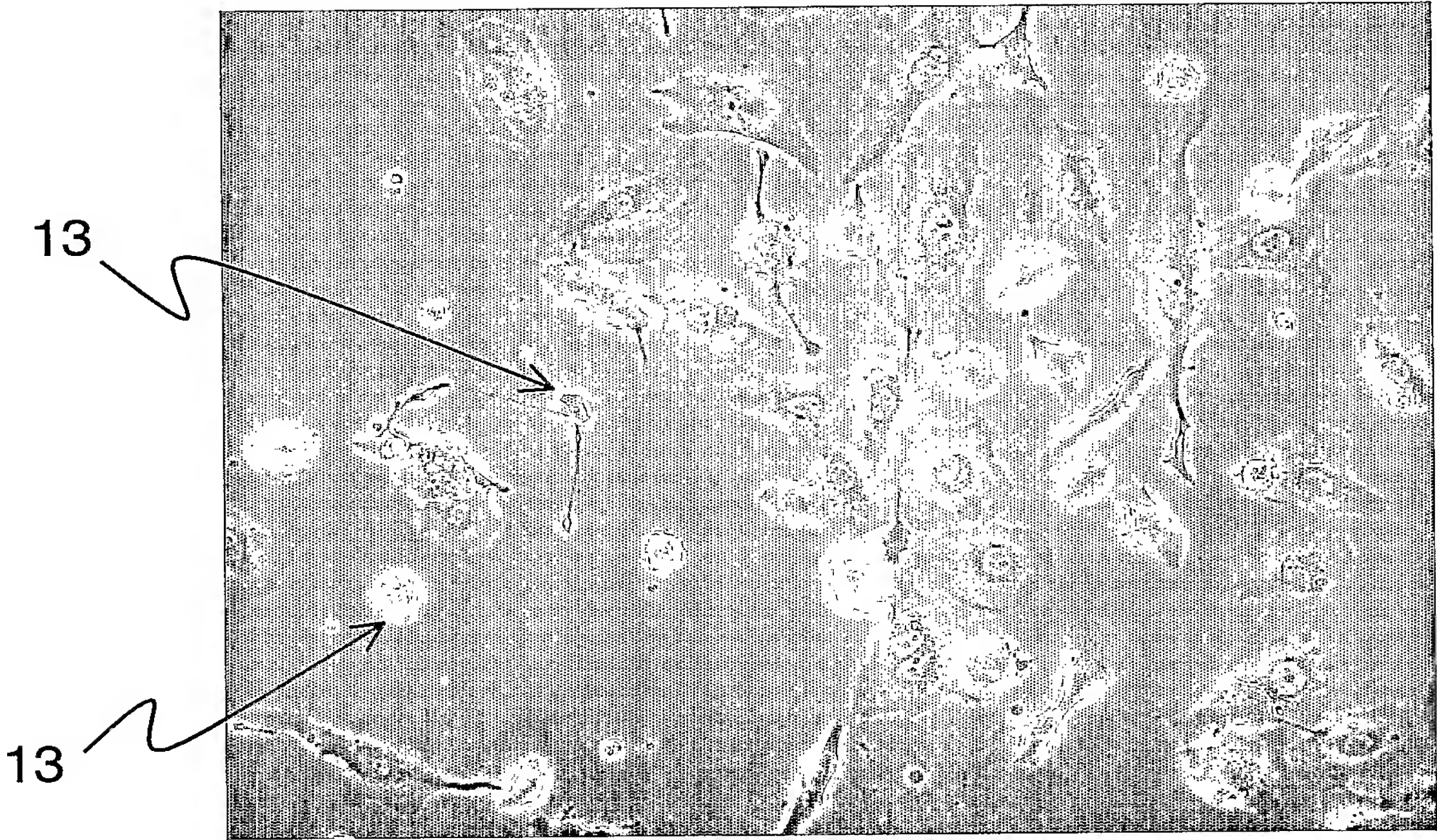
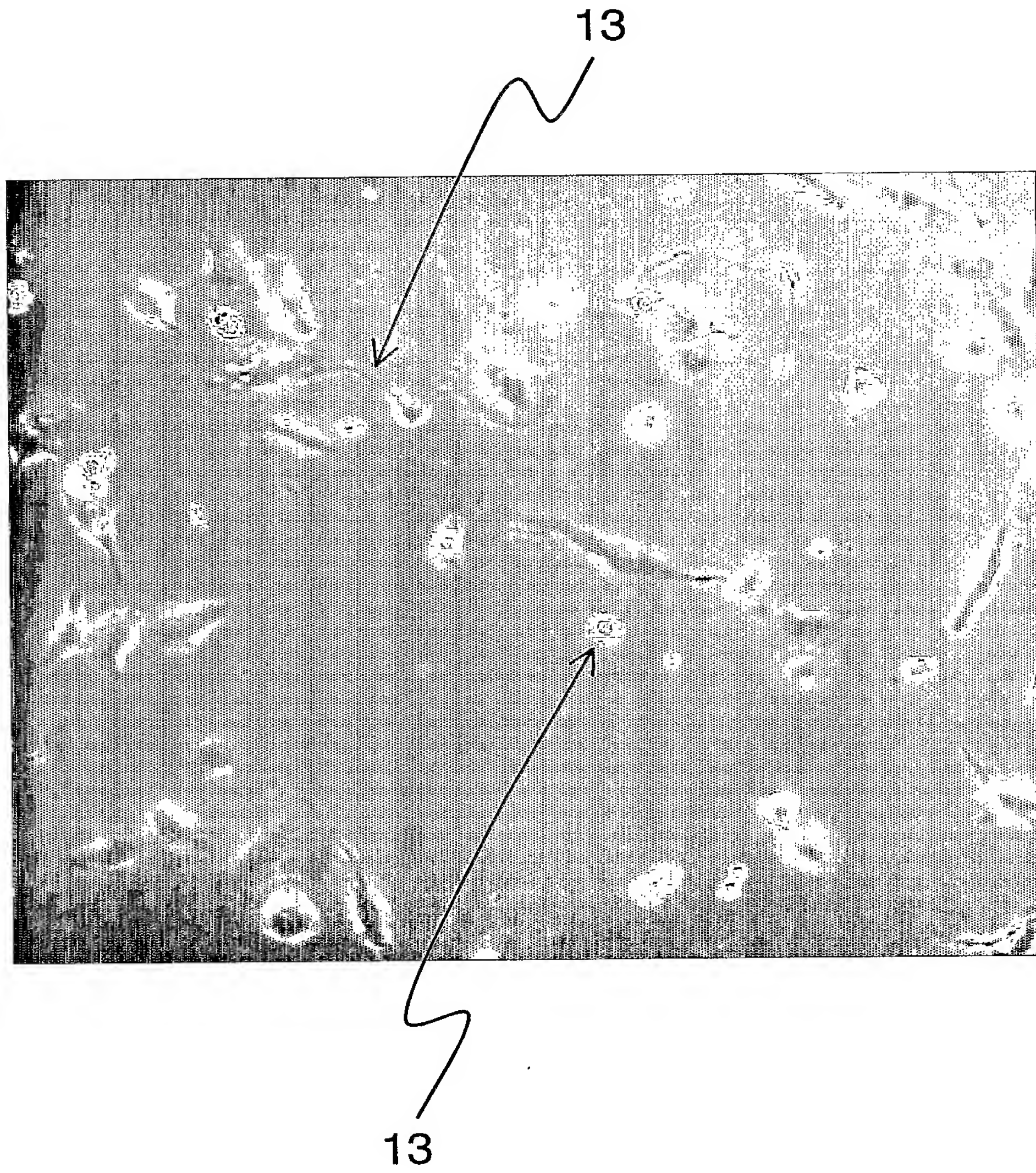


FIG. 8



9/12

FIG. 9



10 / 12

FIG.10

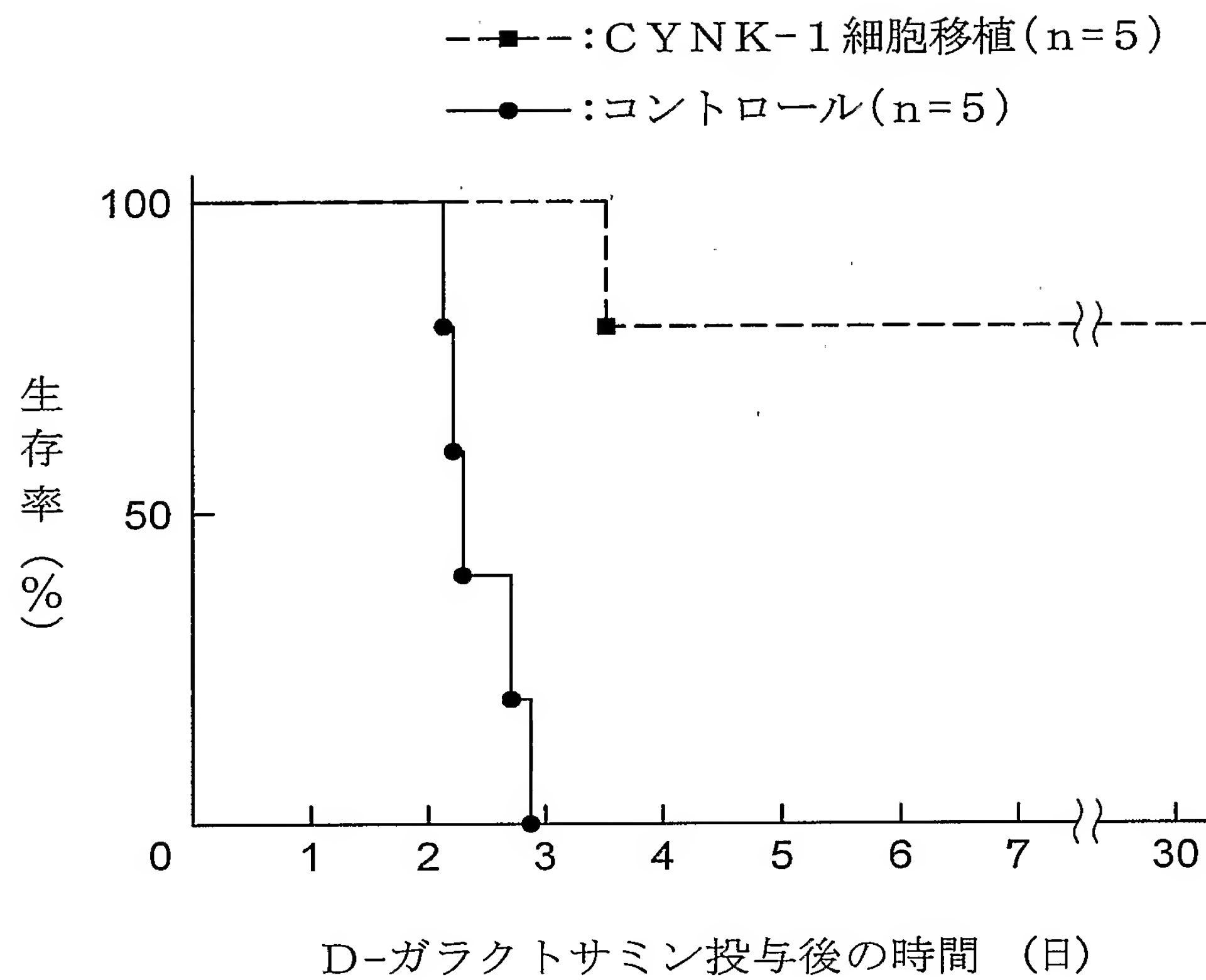
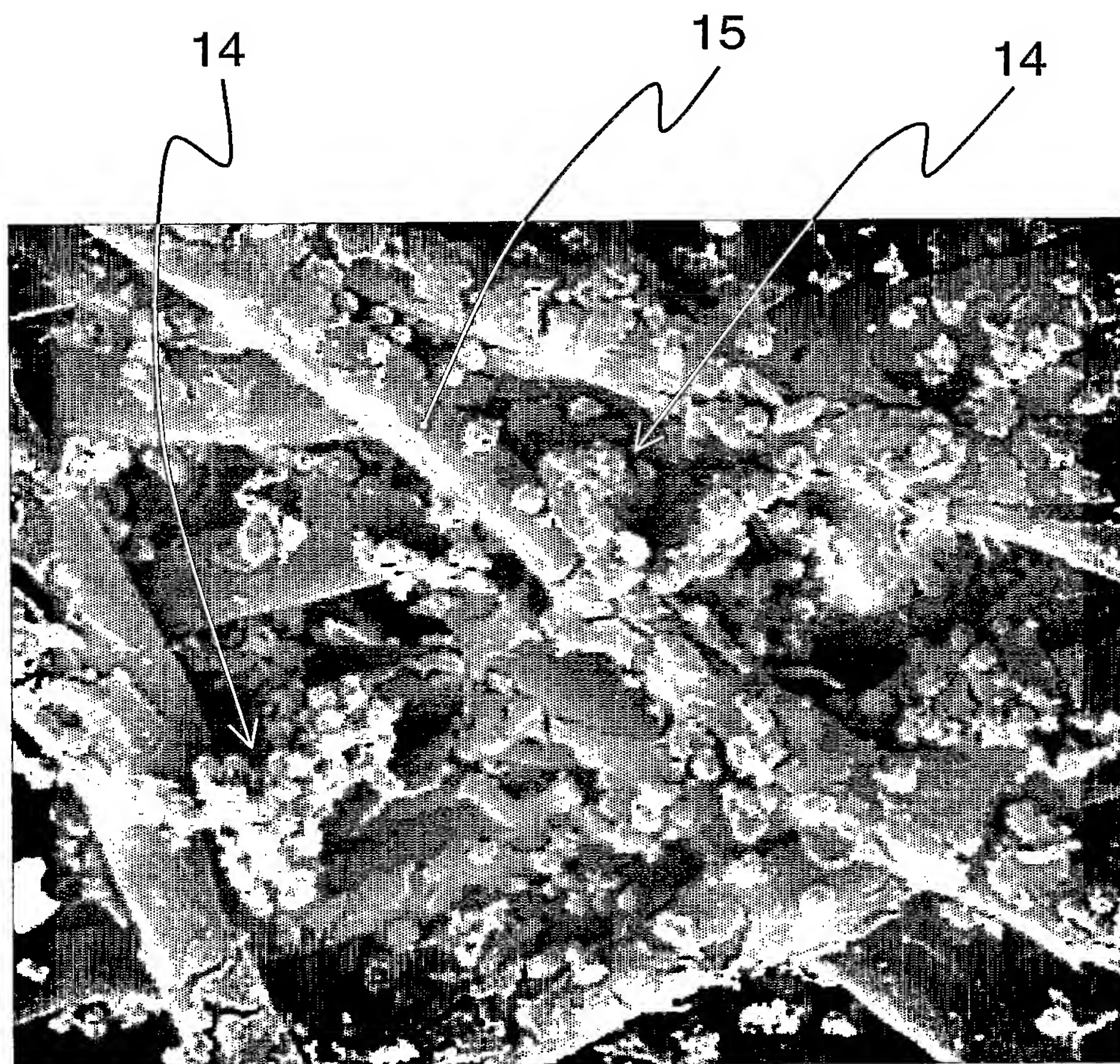
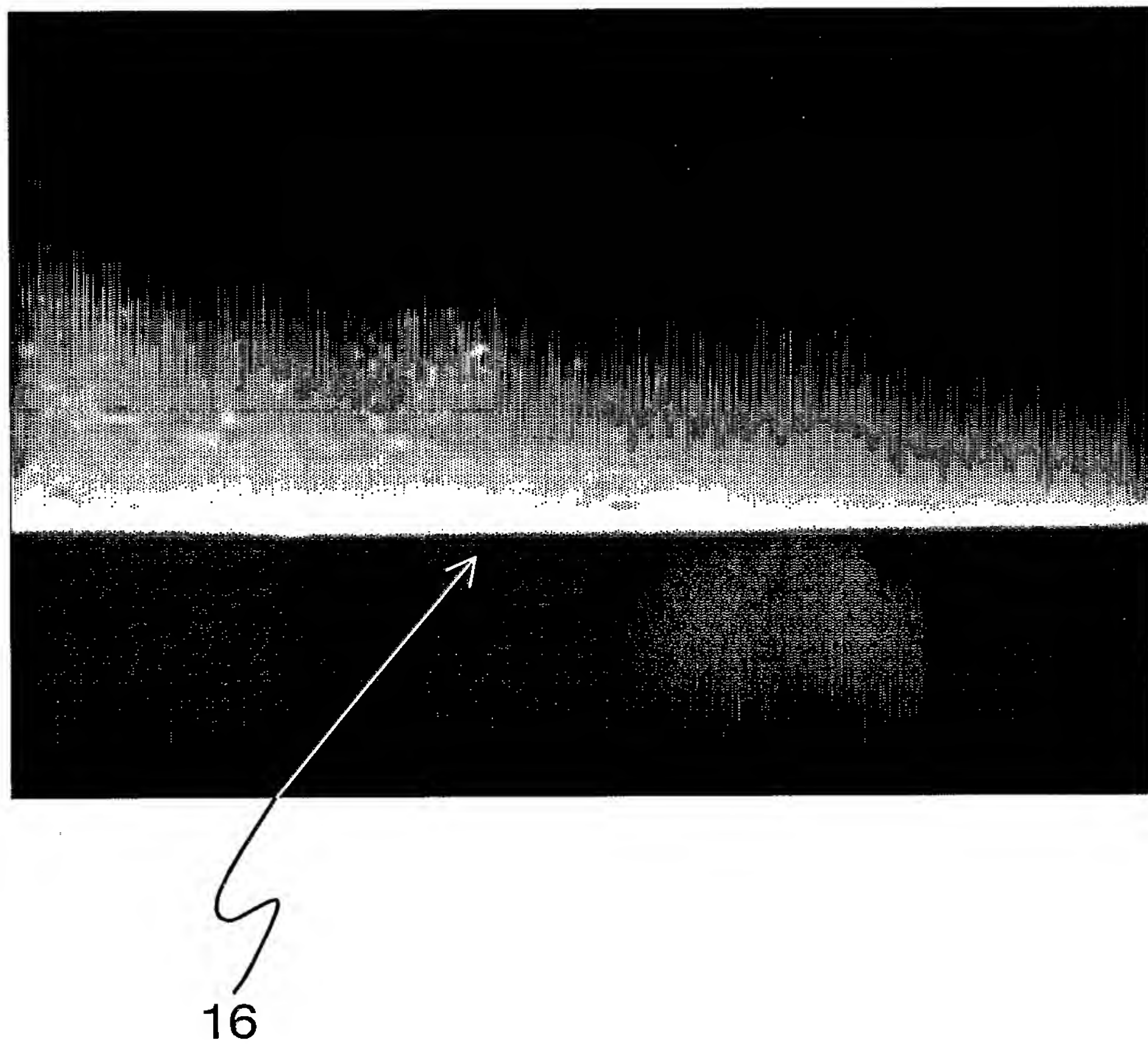


FIG. 11



12 / 12

FIG. 12



1/7

SEQUENCE LISTING

<110> Kobayashi, Naoya

Tanaka, Noriaki

TOKYO METROPOLITAN ORGANIZATION FOR MEDICAL RESEARCH

<120> Immortalized mammalian liver cell line and use thereof

<130> FP-8667PCT

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' Primer for polymerase chain reaction detect albumin gene

<400> 1

aaacctcttg tggaagagcc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 3' Primer for polymerase chain reaction to detect albumin gene

<400> 2

caaagcaggt ctccttatcg

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' Primer for polymerase chain reaction detect ASGPR gene

<400> 3

taggagccaa gctggagaaa

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

3/7

<223> 3' Primer for polymerase chain reaction detect ASGPR gene

<400> 4

acctgcaggc agaagtcac

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' Primer for polymerase chain reaction to detect bilirubin-UGT gene

<400> 5

atgacccgtg cctttatcac

20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 3' Primer for polymerase chain reaction to detect bilirubin-UGT gene

4/7

<400> 6

tcttggattt gtgggctttc

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' Primer for polymerase chain reaction to detect GST- π gene

<400> 7

gccctacacc gtggtctatt

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 3' Primer for polymerase chain reaction to detect GST- π gene

<400> 8

ggctaggacc tcatggatca

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' Primer for polymerase chain reaction to detect GS gene

<400> 9

atgctggagt caagattgcg

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 3' Primer polymerase chain reaction to detect GS gene

<400> 10

tcattgagaa gacacgtgcg

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' Primer for polymerase chain reaction to detect HBCF-X gene

<400> 11

gtgcatggaa gagacctgct

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 3' Primer for polymerase chain reaction to detect HBCF-X gene

<400> 12

gaagtcaagc aggtcgaagg

20

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 5' Primer for polymerase chain reaction to detect SV40T gene

7/7

<400> 13

caggcataga gtgtctgc

18

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> 3' Primer for polymerase chain reaction to detect SV40T gene

<400> 14

caacagcctg ttggcatatg

20

0-1	様式-PCT/RO/134 (SAFE) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.158)
0-1-1	右記によって作成された。	
0-2	国際出願番号	PCT/JP 2004/004699
0-3	出願人又は代理人の書類記号	FP-8667PCT
1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	3, 5, 5, 6, 6, 11, 11, 17, 18, 18
1-2	行	22, 8, 24, 15, 20, 2, 6, 16, 6, 15
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	IPOD 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6
1-3-3	寄託の日付	2004年 03月 10日 (10.03.2004)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-08657
1-4	追加の表示	Cre組換え酵素の標的となるloxP配列間にSV40T遺伝子とHygR・HSVTK融合遺伝子を同時にコードする非ウイルスベクターpYK1をヌクレオフェクターシステムを使用したエレクトロポレーションにより正常ヒト肝細胞に形質導入させて樹立した可逆性不死化ヒト肝細胞株である。
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004699

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N5/00, C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N5/00, C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KOBAYASHI, N. et al., Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes., Science, 18 February, 2000 (18.02.00), Vol.287, pages 1258 to 1262	1-8
X	KOBAYASHI, N. et al., Establishment of a tightly regulated human cell line for the development of hepatocyte transplantation., Hum Cell. 2000 March, Vol.13(1), pages 7 to 13	1-8
X	Naoya KABAYASHI et al., "Kanzo to Saisei Iryo", Saisei Iryo, 2002 November, Vol.1(2), pages 23 to 28	1-8
X	Naoya KABAYASHI et al., "Kansaibo Ishoku ni Muketa Fushika Hito Kansaibokabu no Juritsu", Cell Technology, 2000 June, Vol.19(6), pages 864 to 868	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 May, 2004 (10.05.04)

Date of mailing of the international search report

25 May, 2004 (25.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004699

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WESTERMAN, KA et al., Reversible immortalization of mammalian cells mediated by retroviral transfer and site-specific recombination., Proc Natl Acad Sci USA., 20 August, 1996 (20.08.96), Vol.93(17), page 8971 to 8976	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 5/00, C12N 15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N 5/00, C12N 15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS, JSTplus

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	KOBAYASHI, N et al., Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. Science. 2000 Feb 18, vol. 287, pp. 1258-1262	1-8
X	KOBAYASHI, N et al., Establishment of a tightly regulated human cell line for the development of hepatocyte transplantation. Hum Cell. 2000 Mar, vol. 13(1), pp. 7-13	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10.05.2004

国際調査報告の発送日

25.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4N

9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	小林直哉ら, 肝臓と再生医療. 再生医療. 2002 Nov, vol.1(2), p p. 23-28	1-8
X	小林直哉ら, 肝細胞移植に向けた不死化ヒト肝細胞株の樹立. 細胞 工学. 2000 June, vol.19(6), pp. 864-868	1-8
A	WESTERMAN, KA et al., Reversible immortalization of mammalian cells mediated by retroviral transfer and site-specific reco mbination. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Aug 20, vol.93(17) pp. 8971-8976	1-8